ห้องสมุดคณะเทคโนโลยีการเกษตร

ใบรับรองปัญหาพิเศษปริญญาตรี

ภาควิชาวิทยาศาสตร์การประมง

เรื่อง

การทดสอบประสิทธิภาพและค่า MIC ของ Acriflavin ต่อ *Aeromonas hydrophila* และ *Pseudomonas fluorescence*

Efficiency and MIC test of Acriflavin on *Aeromonas hydrophila* and *Pseudomonas fluorescence*

โดย

นางสาวจันทิมา ดำรงวุฒิ

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษา.....

(ดร.ปวีณา ทวีกิจการ)

ภาควิชารับรองแล้ว

.....

(อาจารย์สมชาย หวังวิบูลย์กิจ)

รักษาการหัวหน้าภาควิชาวิทยาศาสตร์การประมง

วันที่ 18 **เดือน** เมษายน **ปี** 2543

17051
13 พ.ย. 2543
ปพ
ว285ก
2543

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

17051

หอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

ปัญหาพิเศษ

เรื่อง

การทดสอบประสิทธิภาพและค่า MIC ของ Acriflavin ต่อ *Aeromonas hydrophila* และ *Pseudomonas fluorescence*

Efficiency and MIC test of Acriflavin on *Aeromonas hydrophila* and *Pseudomonas fluorescence*

โดย

นางสาวจันทิมา ดำรงวุฒิ

T099294

วพ.
จ285ก
2542

เสนอ

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน.....
วัน.เดือน.ปี.....

ภาควิชาวิทยาศาสตร์การประมง
คณะเทคโนโลยีการเกษตร
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้า
เจ้าคุณทหารลาดกระบัง กรุงเทพมหานคร

พ.ศ. 2542

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทคัดย่อปัญหาพิเศษ

เรื่อง

การทดสอบประสิทธิภาพและค่า MIC ของ Acriflavin ต่อ *Aeromonas hydrophila* และ *Pseudomonas fluorescence*

Efficiency and MIC test of Acriflavin on *Aeromonas hydrophila* and *Pseudomonas fluorescence*

เพื่อศึกษาหาประสิทธิภาพของยาและความเข้มข้นต่ำสุดในการฆ่าเชื้อแบคทีเรีย *Aeromonas hydrophila* และ *Pseudomonas fluorescence* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคสัตว์น้ำ โดยทดสอบที่ระดับความเข้มข้นของยาเหลือง 15 ppm. มีเชื้อเริ่มต้น 1×10^{7} CFU/ml. ในขวดน้ำเกลือขนาด 1,000 ml. พบว่าประสิทธิภาพของยาเหลืองต่อ *Pseudomonas fluorescence* ในน้ำสะอาดให้ผลดีกว่าในน้ำที่มีอินทรีย์สาร โดยในน้ำสะอาดสามารถกำจัดได้หมดภายใน 4 ชั่วโมง ขณะที่ในน้ำที่มีอินทรีย์สารยังคงเหลือเชื้ออยู่ 4.525×10^{7} CFU/ml. ภายในเวลา 24 ชั่วโมง และมีค่า MIC ตามวิธีการของ NCCLS เท่ากับ 150 ppm. ส่วนประสิทธิภาพของยาเหลืองต่อ *Aeromonas hydrophila* พบว่าในน้ำที่มีอินทรีย์สารจะให้ผลดีกว่าในน้ำสะอาด และพบว่าที่ 15 นาที เชื้อแบคทีเรียคงเหลือ 2.5×10^{2} CFU/ml. หลังจากนั้นสามารถกำจัดได้หมดภายใน 30 นาที ซึ่งในน้ำสะอาดจำนวนแบคทีเรียคงเหลือ 6×10^{3} CFU/ml. ภายในเวลา 24 ชั่วโมง และค่า MIC เท่ากับ 125 ppm. จากการศึกษาครั้งนี้การนำยาเหลืองไปใช้เพื่อกำจัดเชื้อ *Aeromonas hydrophila* ในน้ำที่มีอินทรีย์สาร สามารถใช้ที่ระดับความเข้มข้น 15 ppm. และสำหรับ *Pseudomonas fluorescence* ควรใช้ที่ความเข้มข้นสูงกว่า 15 ppm. แต่ทั้งนี้ต้องคำนึงถึงความทนได้ของสัตว์น้ำด้วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คำนิยม

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ ดร.ปวีณา ทวีกิจการ เป็นอย่างสูงที่กรุณาให้คำปรึกษาและคำแนะนำ ตลอดจนการเอาใจใส่ดูแลจนทำให้ปัญหาพิเศษของข้าพเจ้าในครั้งนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี ร่วมถึงอาจารย์มณฑล แก่นมณี และอาจารย์ทุกท่านในภาควิชาวิทยาศาสตร์การประมง

ขอขอบคุณ คุณบุปผา จงพัฒน์ และเจ้าหน้าที่ทุกท่านในภาควิชาวิทยาศาสตร์การประมงคที่ช่วยอำนวนความสะดวกด้านเทคนิค

ขอขอบคุณ คุณจิรพรรณ ดำรงวุฒิ ที่ช่วยให้คำปรึกษาในด้านข้อมูลและปัญหาต่างๆ ที่เกิดขึ้น รวมทั้งคุณศักดิ์ชาย บุญญาทวี ที่ช่วยอำนวยความสะดวกในการค้นคว้าข้อมูลต่างๆ

ขอขอบคุณ คุณรักชนก ช่างไม้ และคุณธาดา บัวขาว ที่ช่วยในการจัดพิมพ์ปัญหาพิเศษเล่มนี้

ขอขอบคุณ คุณกิตติธร พุทธรักษา และเพื่อนๆ ทุกคนที่คอยช่วยส่งแรงกายและแรงใจเป็นอย่างดีเสมอมา โดยเฉพาะอย่างยิ่ง คุณจุฑารัตน์ แสงกุล คุณสุทธิกานต์ อินทรเรืองศรี คุณกาหลง นิยมสุข คุณตะวัน รัตนวิภาค และคุณกิตติศักดิ์ สุกใส

คุณความดีใดๆ อันเกิดขึ้นกับข้าพเจ้าในครั้งนี้ ขอยกให้กับบุพการีทั้งสองท่านอันเป็นที่เคารพและบูชา ของข้าพเจ้าอย่างหาที่เปรียบมิได้

นางสาวจันทิมา ดำรงวุฒิ

8 มีนาคม 2543

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	ก
สารบัญตาราง	ข
สารบัญภาพ	ค
คำนำ	1
การตรวจเอกสาร	3
อุปกรณ์และสารเคมี	16
วิธีการทดลอง	17
ผลการทดลอง	21
สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง	32
ข้อเสนอแนะ	35
บรรณานุกรม	36
ภาคผนวก	40

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

1. จำนวนเชื้อแบคทีเรีย *Aeromonas hydrophila* (CFU/ml.) ที่ระดับ OD (Oplical Density) ต่างๆ 24
2. จำนวนแบคทีเรีย *Pseudomonas fluorescence* (CFU/ml.) ที่ระดับ OD (Optical Donsity) ต่างๆ 24
3. จำนวนแบคทีเรีย *A. hydrophila* ที่เหลือรอดในช่วงเวลาต่างๆ หลังจากสัมผัสกับสารละลาย Acriflavin ความเข้มข้น 15 ppm. ในน้ำสะอาด 25
4. จำนวนแบคทีเรีย *A. hydrophila* ที่เหลือรอดในช่วงเวลาต่างๆ หลังจากสัมผัสกับสารละลาย Acriflavin ความเข้มข้น 15 ppm. ในน้ำที่มีอินทรีย์สาร 25
5. จำนวนแบคทีเรีย *P. fluorescence* ที่เหลือรอดในช่วงเวลาต่างๆ หลังจากสัมผัสกับสารละลาย Acriflavin ความเข้มข้น 15 ppm. ในน้ำสะอาด 26
6. จำนวนแบคทีเรีย *P. fluorescence* ที่เหลือรอดในช่วงเวลาต่างๆ หลังจากสัมผัสกับสารละลาย Acriflavin ความเข้มข้น 15 ppm ในน้ำที่มีอินทรีย์สาร 26

ตารางผนวกที่

1. การวิเคราะห์สมการกราฟมาตรฐานด้วยวิธีทางสถิติ Regression ของเชื้อ *Aromonas hydrophila* 43
2. การวิเคราะห์สมการกราฟมาตรฐานด้วยวิธีทางสถิติ Regression ของเชื้อ *Pseudomonas fluoresecence* 44

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ

ภาพที่ หน้า

1. ความสัมพันธ์ระหว่างค่า Optical density (OD) กับจำนวนเชื้อแบคทีเรีย *Pseudomonas fluorescence* ที่ 24 ชั่วโมง อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส 27
2. ความสัมพันธ์ระหว่างค่า Optical density (OD) กับจำนวนเชื้อแบคทีเรีย *Acromonas hydrophila* ที่ 24 ชั่วโมง อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส 28
3. ผลการศึกษาประสิทธิภาพของ Acriflavin ความเข้มข้น 15 ppm. ต่อเชื้อ *A. hydrophila* ภายในเวลา 24 ชั่วโมง 29
4. ผลการศึกษาประสิทธิภาพของ Acriflavin ความเข้มข้น 15 ppm. ต่อเชื้อ *P. fluoresecnce* ภายในเวลา 24 ชั่วโมง 30
5. ลักษณะหลอดทดสอบค่า MIC ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ของยาเหลือง (Acriflavin) ซึ่งจะนำหลอดที่มีความขุ่นไป Speard plate ที่เวลา 24 ชั่วโมง 31
6. ลักษณะจำนวน Colony ของเชื้อแบคทีเรีย *A. hydrophila* ที่ถูกยับยั้งด้วยยาเหลือง (Acriflavin) ในการทดสอบหาค่า MIC 31

ภาพผนวกที่

1. การ dilution แบบ ten – fold เพื่อนับจำนวน Colony ในการทำ Standard Curve .. 41
2. ขั้นตอนการทดสอบค่า MIC ตามวิธีการของ NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standard) 42

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การทดสอบประสิทธิภาพและค่า MIC ของ Acriflavin ต่อ *Aeromonas hydrophila* และ *Pseudomonas fluorescence*

Efficiency and MIC test of Acriflavin on *Aeromonas hydrophila* and *Pseudomonas fluorescence*

คำนำ

ในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำปัญหาหนึ่งที่จะหลีกเลี่ยงไม่ได้คือการเกิดโรคระบาดในสัตว์น้ำ ซึ่งการเกิดโรคระบาดอาจจะต้องประกอบไปด้วยปัจจัยต่างๆ ร่วมกัน เช่น สัตว์น้ำต้องอยู่ในสถานที่อ่อนแอ มีความต้านทานต่อเชื้อโรคน้อย เชื้อโรคมีความรุนแรงและสภาพแวดล้อมต้องมีความเหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเชื้อโรค

หลักในการป้องกันและกำจัดโรคสัตว์น้ำมักมุ่งลดปัจจัยที่ทำให้เกิดโรคเพื่อไม่ให้สัตว์น้ำเป็นโรคหรือเป็นโรคน้อยที่สุด โดยการป้องกันมีหลายวิธี เช่น เลี้ยงสัตว์น้ำให้มีความแข็งแรงอยู่เสมอด้วยการให้อาหารที่มีประโยชน์แก่สัตว์น้ำในอัตราส่วนที่พอเพียงและสม่ำเสมอ พิจารณาถึงอัตราการปล่อยสัตว์น้ำต่อปริมาณน้ำ คัดเลือกพันธุ์สัตว์น้ำที่มีความต้านทานโรคสูง ป้องกันการติดโรคจากแหล่งหนึ่งมาสู่อีกแหล่งหนึ่ง หรือจากสัตว์น้ำกลุ่มหนึ่งมาสู่สัตว์น้ำอีกกลุ่มหนึ่ง อย่างไรก็ตามวิธีการข้างต้นอาจจะไม่สามารถยับยั้งหรือป้องกันลดการแพร่ระบาดของโรคได้อย่างมีประสิทธิภาพ จึงอาจจะมีความจำเป็นต้องใช้ยาหรือสารเคมีป้องกัน และกำจัดโรคสัตว์น้ำ (สิทธิ. 2524)

ปัจจุบันยาและสารเคมีที่นำมาใช้ป้องกันรักษาโรคสัตว์น้ำโดยเฉพาะที่มีสาเหตุมาจากเชื้อแบคทีเรียมีมากมายหลายชนิด ซึ่งในจำนวนนั้นพบว่า ยาเหลือง (Acriflavin) เป็นสารเคมีชนิดหนึ่งที่เกษตกรนิยมนำมาใช้ในการป้องกันโรค โดยผสมน้ำระหว่างมีการขนส่ง หรือมีการใช้ก่อนและหลังจากการขนส่งเพื่อลดอัตราการติดเชื้อ ซึ่งในการใช้จำเป็นต้องทราบประสิทธิภาพและความเข้มข้นที่เหมาะสมเพื่อลดต้นทุนการผลิตเนื่องจากเป็นสารเคมีที่มีราคาแพง การศึกษาค้นคว้าถึงระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียจึงเป็นสิ่งจำเป็น ซึ่งจะแตกต่างกันออกไปโดยอาจจะขึ้นอยู่กับระยะเวลาต่างๆ ที่ยาสามารถออกฤทธิ์ในการยับยั้งหรือกำจัดแบคทีเรียได้ดีที่สุด ดังนั้นการทดสอบค่า MIC (Minimum Inhibitory Concentration) และประสิทธิภาพของยาเหลือง (Acriflavin) นี้ก็เพื่อต้องการที่จะทราบถึงระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมที่สุดในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย ตลอดจนระยะเวลาที่เหมาะสมที่สุดในการรักษาโรค ซึ่งจะทำให้ทราบข้อมูลในการตัดสินใจใช้ยาให้เกิดประโยชน์สูงสุดและไม่เป็นอันตรายต่อสัตว์น้ำ โดยการศึกษาครั้งนี้จะเลือกใช้เชื้อ *Aeromanas hydrophila* และเชื้อ *Pseudomonas fluorescence* เป็นแบคทีเรียในการทดสอบเนื่องจากเป็นแบคทีเรียที่พบทั่วไป และมี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รายงานก่อให้เกิดโรคระบาดในสัตว์หลายชนิด (สิทธิและคณะ. 2526) แบคทีเรียทั้ง 2 ชนิดส่วนใหญ่จะทำให้เกิดอาการที่เรียกว่า haemorrhagic secpticemia (สิทธิและคณะ. 2526) ในสัตว์น้ำหลายชนิดและพบว่าเป็นสาเหตุให้เกิดการติดเชื้อไวรัสอย่างเฉียบพลันมีผลทำให้เนื้อเยื่อตาย (Inglis *et al.* 1993) การป้องรักษาอาจจะต้องมีการควบคุมปัจจัยต่างๆ ที่ก่อให้เกิดโรคหรืออาจจะมีการใช้ยาและสารเคมีในการป้องกันและกำจัดเชื้อโรคต่างๆ

<u>วัตถุประสงค์</u>

1. *เพื่อหาค่า MIC ของ Acriflavin ที่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย Aeromonas hydrophila และ Pseudomonas fluorescence*
2. เพื่อศึกษาถึงประสิทธิภาพของยาเหลืองในการกำจัดเชื้อแบคทีเรีย *Aeromonas hydrophila* และ *Pseudomonas fluorescence* ที่ระยะเวลาต่างกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตรวจเอกสาร

1. ลักษณะทั่วไปของยาเหลือง (Acriflavin)

Acriflavin เป็นสารประกอบระหว่าง 2, 8 – diamino – 10 – methylacridinium chloride กับ 2, 8 – diamino acridine เมื่ออบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จะมีคลอรีนไม่ต่ำกว่า 13.3 % แต่ไม่เกิน 15.8% มีไนโตรเจนเป็นส่วนประกอบประมาณ 16.2% ยาเหลืองเป็นผงสีส้มเข้ม 1 กรัม จะละลายในน้ำได้ประมาณ 3 ml. ละลายไม่ดีในแอลกอฮอล์ ไม่ละลายในอีเทอร์ คลอโรฟอร์ม และน้ำมัน เมื่อละลายในน้ำจะมีสีส้มแดงสะท้อนแสง

ในทางการแพทย์ จะใช้เป็นยายับยั้งและฆ่าเชื้อแบคทีเรีย ซึ่งโดยทั่วไปจะใช้เฉพาะที่ ความเข้มข้นที่ใช้ 1 : 10,000 – 1 : 1,000

ความเป็นพิษในคน ถ้าได้รับยาเหลืองในการกินเข้าไปจำนวนมากๆ จะทำให้ความดันเลือดต่ำกว่าปกติ และเกิดภาวะ bradycardia

การใช้ในสัตว์ จะใช้รักษาบาดแผล ความเข้มข้นที่ใช้ในสัตว์ใหญ่ เช่น ม้า วัว จะให้กินที่ความเข้มข้น 0.5 – 5.0 กรัม และถ้าใช้ฉีดจะใช้ที่ความเข้มข้น 0.5 – 1.0 กรัม ส่วนในแกะและหมู จะให้กินที่ความเข้มข้น 1 กรัม และฉีดที่ความเข้มข้น 50 – 250 มิลลิกรัม (Stecher *et al.* 1960)

การใช้ในสัตว์น้ำโดยทั่วไปจะใช้เป็นยาฆ่าเชื้อโรคในไข่ปลา เป็นยาต้านจุลชีพใช้รักษาพวกโปรโตซัวภายนอก อัตราที่ใช้ได้มีการแนะนำไว้คือ Acriflavin 10 mg/l แช่นาน 1 ชั่วโมง หรือ 2 mg/l แช่นานกว่า 1 ชั่วโมง โดยแช่ได้นานหลายวันเนื่องจากมีความเป็นพิษต่อปลาต่ำ (Plumb, 1992)

นอกจากนี้ได้มีการศึกษาถึงการใช้ยาและสารเคมีในการรักษาโรคในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำในประเทศไทย พบว่า ยาเหลืองที่ความเข้มข้น 25.0 ppm. แช่ตลอดจะสามารถรักษาโรคที่เกิดจากเชื้อ *Flexibacter columnaris* ที่เกิดในปลากะพง Sea bass ได้ (Tonguthai. and Chanratchakool. 1992) ส่วนที่ความเข้มข้น 5.0 ppm. จะสามารถรักษาโรคที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรียในปลา Walking Catfish โดยแช่เป็นระยะเวลานาน (Tonguthai and Chanratchakool. 1992)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. แบคทีเรียที่ใช้ทดสอบ

2.1 Aerononas hydrophila

2.1.1 คุณสมบัติของเชื้อ

A. hydrophila พบครั้งแรกโดย Sanarelli ในปี ค.ศ. 1891 (Roberts, 1978) ซึ่งเรียกแบคทีเรียชนิดนี้ว่า Bacillus hydropilus fuscus แต่เดิม *A. hydrophila* จัดอยู่ไว้ในกลุ่ม Aeromonads ซึ่งมีอยู่ 3 ชนิดคือ *Aeromanas punctata*, *A. hydrophila* และ *A. liguetaciens* ต่อมาได้มีการแบ่ง *A. hydrophila* ออกเป็น 2 Subspecies คือ *A. hydrophila* subspecies anaerogens ซึ่งเป็นพวกที่ไม่ให้ก๊าซจากการใช้กลูโคสหรือไกลโคเจน กับ *A. hydrophila* subspecies protcolytica *A. hydrophila* เป็น chemoorganotroph จึงเจริญได้ดีในที่มีสารอินทรีย์ เพื่อ ferment น้ำตาลหรือคาร์โบไฮเดรตจะให้กรดแต่เพียงอย่างเดียวหรือให้ทั้งกรดและก๊าซ นอกจากนี้ยังสร้างเอนไซม์ oxidase และเปลี่ยนไนเตรทให้เป็นไนไตรท์ได้ (ประกิตติ์สิน และคณะ. 2526 ข.)

2.1.2 ที่อยู่อาศัย

โดยทั่วไป *A. hydrophila* จะอยู่ในน้ำจืดที่มีพวกสารอินทรีย์สูงและได้มีรายงานจากญี่ปุ่นและอเมริกาว่า *A. hydrophila* อาจจะอาศัยเป็นพวกจุลชีพในบริเวณลำไส้หรืออวัยวะต่างๆ ของปลา (Roberts, 1978)

2.1.3 รูปร่างลักษณะ

A. hydrophila เป็นแบคทีเรียแกรมลบไม่สร้างสปอร์มีคุณสมบัติทางชีวเคมีคล้ายแบคทีเรียบางชนิดใน Order Pseudomonadales. Family Enterobacteraceae มีลักษณะเป็นรูปร่างแท่งส่วนใหญ่สามารถเคลื่อนที่ได้เนื่องจากมีแส้ (Flagellum) อยู่ทั่วปลายด้านหนึ่งของเซลล์แต่มีบางชนิดเคลื่อนที่ไม่ได้ (Robert, 1978) โคโลนีที่ขึ้นอยู่บนอาหารเลี้ยงเชื้อธรรมดา มีลักษณะกลมโค้งและผิวเรียบ เส้นผ่าศูนย์กลาง 0.7 – 0.8 um × 1.0 – 1.5 um.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.1.4 การเพาะเชื้อ

Roberts, (1978) กล่าวว่า *A. hydrophila* ที่แยกได้มาจากไตหรือเลือดปลาจะทำการแยกเชื้อออกจากสิ่งเจือปนโดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ Rimler – Shetts medium อาหารเลี้ยงเชื้อนี้ประกอบด้วยกรดอะมิโนบางชนิดและเติมยาปฏิชีวนะ Novobiocin ลงไปด้วยเพื่อช่วยให้สามารถแยกเชื้อ *A. hydrophila* ออกจากแบคทีเรียพวกอื่นๆได้ง่ายขึ้น โดยโคโลนีของ *A. hydrophila* ที่อยู่บนอาหารเลี้ยงเชื้อจะมีสีเหลืองซึ่งเป็นผลจากการที่แบคทีเรียนี้ ferment น้ำตาล moltose ได้ (ประกิตติ์สินและคณะ. 2526 ก.)

2.1.5 การแพร่ระบาด

Roberts, (1978) พบว่าโดยทั่วไป *A. hydrophila* จะทำให้เกิดโรค haemorrhagic septicemia ซึ่งถ้าปลาอยู่ในสภาวะแวดล้อมที่ทำให้เครียดและในช่วงฤดูที่มีอากาศไม่เหมาะสม

2.1.6 อาการของโรค

ปลาที่มีเชื้อ *A. hydrophila* จะทำให้บริเวณผิวหนังเป็นสีดำๆ ขนาดใหญ่ อาจไม่สม่ำเสมอกัน ซึ่งเป็นอาการตกเลือด (haemorrhage.) ตามผิวลำตัวและที่บริเวณครีบ จะทำให้เนื้อเยื่ออวัยวะภายในตายเนื่องจากอวัยวะภายในเกิดตกเลือกอย่างมาก ไตและม้ามเกิดการบวมน้ำขยายใหญ่จะเห็นเป็นน้ำของเหลวไหลออกมาภายในช่องท้อง ผนังลำไส้ที่ผลิตเมือกจะเกิดการตายของเนื้อเยื่อและบริเวณช่องว่างภายในหลอดเลือดจะมีการถลอก ซึ่งจุดสำคัญที่เกิดการตายของเนื้อเยื่อ ได้แก่ กล้ามเนื้อ หัวใจ ตับ gonad และตับอ่อน ผิวหนังเกิดการสึกกร่อน บริเวณหนังแท้เกิดการบวมน้ำผิวหนังชั้นนอกเกิดเป็นแผลเปื่อย (Roberts, 1978)

2.1.7 การรักษา

ควรมีการปรับปรุงสภาพสิ่งแวดล้อม โดยลดปริมาณสารอินทรีย์ในน้ำที่ทำให้เกิดปัญหามลพิษ หรืออาจจะมีการใช้ยาปฏิชีวนะหรือสารเคมีที่มีประสิทธิภาพสามารถกำจัดและรักษาโรคได้แต่อาจจะมีผลกระทบต่อความอยากกินอาหารของปลา ควรมีการใช้ยาเท่าที่จำเป็น (Roberts, 1978)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2 Pseudomonas fluorescence

2.2.1 คุณสมบัติของเชื้อ

P. fluorescence อยู่ใน Family Pseudomonadacrae จะแบ่งเป็น 3 Spccies คือ *P. anguilliseptica, P. chloraphis* และ *P. fluorescence* (Ingris *et al.* 1993) เป็นแบคทีเรียที่ใช้ออกซิเจนไม่สามารถเจริญเติบโตในน้ำตาลกลูโคส ลักษณะโคโลนีกลมนูนหรือแบน โปร่งแสง สามารถมองเห็นเป็นสีเหลือง, โคโลนีที่เป็นสีเหลือง – เขียว เป็นพวก fluorescence ภายใต้แสง ultra – violet (Inglis *et al.* 1993) *Pseudomanas sp.* เป็นแบคทีเรียชนิดหนึ่งที่ช่วยลดระดับไนเตรทที่มีมากเกินพอ โดยจะทำงานในสภาพที่มีออกซิเจนและยังสามารถควบคุมสารประกอบอินทรีย์ที่ละลายในน้ำได้ (สมาน. 2538)

2.2.2 ที่อยู่อาศัย

P. fluorescence อาศัยอยู่ในดินและในน้ำ โดยปกติจะเป็นสาเหตุทำให้อาหารเกิดการเน่าเสีย และยังอาศัยอยู่ในตัวปลา

2.2.3 รูปร่างลักษณะ

P. fluorescence มีขนาด 0.8 um. × 2.0 – 3.0 um. (Roberts, 1978) เป็นแบคทีเรียแกรมลบ เคลื่อนที่โดยใช้ Flagellum มีลักษณะเซลล์เป็นแท่งตรงหรือโค้ง

2.2.4 การเพาะเชื้อ

P. fluorescence เจริญเติบโตได้ดีในอาหารธรรมดาที่ 22 – 25 องศาเซลเซียส อาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วย Cetrimide จะยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียแกรมลบเป็นส่วนใหญ่ แต่ก็อาจจะใช้เป็นอาหารในการแยกเชื้อ *Pseudomanas sp.* จากการปนของแบคทีเรียชนิดอื่นๆ ได้ ซึ่ง *P. fluorescence* จะสามารถผลิตเม็ดสี เหลือง – เขียว ที่เป็น fluorescence ภายใต้แสง UV ได้เม็ดสีที่ทำการผลิตขึ้นสามารถทำให้มีมากขึ้น โดยใช้อาหารพิเศษเฉพาะ *P. fluorescence* จะมีการผลิต gelatin ด้วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.5 การแพร่ระบาด

P. fluorescence เป็นแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรค Pseudomonas Septicemia ซึ่งบางครั้งจะแยกไม่ออกจาก Aeromonad septicemia และอาจจะมีเชื้อ Aeromanad เกิดขึ้นพร้อมกันก็ได้ ถ้าสภาวะแวดล้อมทำให้สัตว์เกิดการเครียด โดยเฉพาะอย่างยิ่งที่มีอุณหภูมิสูง หรือเลี้ยงปลาหนาแน่นเกินไป เชื้อนี้สามารถแพร่ได้ในปลาเขตร้อน , ปลาน้ำเค็ม และ Salmonid ซึ่งถ้าปลาเป็นโรคนานๆ จะทำให้เกิดการติดเชื้อไวรัสได้ (Roberts, 1978)

2.2.6 อาการของโรค

อาการ Pseudomonas septicemia อาจจะมีอาการเฉียบพลันหรือเรื้อรัง บริเวณผิวหนังเกิดการสึกกร่อน ถลอกเป็นแผล ตกเลือดบริเวณกว้างแล้วจะทำให้เกิดการตายของเนื้อเยื่อ และยังจะมีผลต่ออวัยวะภายในทำให้เกิดการตกเลือดและเยื่อบุช่องตัวอับเสบ เป็นพิษต่อโปรตีนที่ทำให้เลือดแข็งตัว (Fibrinous) ที่บริเวณผิวหนังโดยทำให้ท่อเลือดที่ผิวหนังชั้นในเกิดการพองขยายออกเกิดการบวมน้ำและเกิดแผลเปื่อยอย่างรวดเร็ว

2.2.7 การรักษา

ควรมีการป้องกันโดยมีการจัดการในด้านการเลี้ยงให้ดี มีการควบคุมในเรื่องคุณภาพน้ำให้มีคุณภาพและลดการเลี้ยงปลาอย่างหนาแน่น หรืออาจจะใช้สารเคมีหรือยาปฏิชีวนะในการรักษาและกำจัดเชื้อแบคทีเรีย (Inglis *et al.* 1993)

3. MIC (Minimum Inhibitory Concentration)

MIC หมายถึง ระดับความเข้มข้นต่ำสุดของยาปฏิชีวนะหรือยาต้านจุลชีพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย (Lorian, 1991) หน่วยที่ใช้โดยทั่วไปคือ µg/ml., mcg/ml. หรือหน่วยสากล Iu/ml. (International unit) (นันทนา. 2537)

3.1 ปัจจัยที่มีผลกระทบต่อการทดสอบค่า MIC (นันทนา. 2537)

ปัจจัยหลายชนิดที่มีผลต่อค่า MIC ของยาต้านจุลชีพบางชนิดอาจจะทำให้ค่านี้เพิ่มขึ้นหรือลดลงจะมีปัจจัยที่สำคัญได้แก่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1. *ตัวยาทดสอบ* ต้องใช้ชนิด Laboratory reference standard ไม่ใช่ชนิดที่ใช้กับผู้ป่วย ซึ่งอาจจะมีสารอื่นปน หรือมีความแรงของยาไม่ตรงตามที่บ่งบอก สำหรับ laboratory refercnce standard ควรอยู่ในลักษณะของผง แหล่งที่หาได้คือ โรงงานที่ผลิต หรือบริษัทที่จำหน่ายยาชนิดอื่นๆ หน่วยราชการที่ทำการวิเคราะห์ยา

2. *การเลือกระดับความเข้มข้นที่จะทดสอบควรมีหลักเกณฑ์ดังต่อไปนี้*

2.1 ความเข้มข้นของยาที่ทดสอบ ควรให้มากกว่าระดับสูงสุดที่พบในเนื้อเยื่อและของเหลวในร่างกายอย่างน้อยหนึ่งความเข้มข้น

2.2 เลือกความเข้มข้นยา โดยดูจากการกระจายตัวของค่า MIC ที่ได้จากผลการทดสอบความไวของกลุ่มเชื้อแต่ละชนิดต่อยา ซึ่งรวบรวมจากผู้อื่นที่เคยทำไว้ ซึ่งลักษณะการกระจายตัวเหล่านี้ อาจเหมือนหรือต่างกัน จะสามารถช่วยเป็นแนวทางเพื่อเลือกระดับยาที่ทดสอบได้

2.3 ความเข้มข้นสูงสุดที่ทดสอบมักไม่ให้สูงกว่า ระดับที่คาดว่าจะก่อให้เกิดพิษหนึ่งหรือสองความเข้มข้น

3. *อาหารเลี้ยงเชื้อ* อาหารเลี้ยงเชื้อที่ดีควรยอมให้เชื้อทุกชนิดเจริญได้ ไม่มีการเปลี่ยนแปลงความเป็นกรด – ด่าง (pH) มาก ขณะที่มีเชื้อเจริญไม่มีสารรบกวนออกฤทธิ์ของยา มีส่วนผสมในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว และอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเดียวกันเหมือนกัน แม้จะมาจากแหล่งผลิตหรือครั้งที่ผลิตต่างกันยาต้านจุลชีพที่ถูกรบกวนจากส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อแตกต่างกัน อันได้แก่

3.1 pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อ มีผลกระทบการออกฤทธิ์ของยาบางชนิด เช่น การทดสอบยาที่จะนำมารักษาโรคติดเชื้อ บริเวณที่มี pH ต่ำหรือสูงกว่า

3.2 บัฟเฟอร์ (buffer) ในอาหารเลี้ยงเชื้อบางชนิด อาจมีผลกระทบต่อการออกฤทธิ์ของยาบางชนิดได้

3.3 ปริมาณอิออนที่ปรากฏในอาหารเลี้ยงเชื้อ มีผลกระทบต่อความไวของเชื้อ และการออกฤทธิ์ของยาต่อเชื้อได้

3.4 Osmolality ของอาหารเลี้ยงเชื้อมีผลต่อการทดสอบได้เช่นกัน

3.5 อาหารเสริมในอาหารเลี้ยงเชื้อ เช่น การเติมเลือดจะทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อเหลวอ่านค่า MIC ไม่ได้ อาหารเสริมที่มีโปรตีนจะทำให้ค่า MIC ของยาที่จับกับโปรตีนมีค่าสูงขึ้น

3.6 วุ้น (agar) ในอาหารเลี้ยงเชื้อ เป็นสารประกอบเชิงซ้อนของ polysaccharider ที่เตรียมได้จากสาหร่ายทะเลบางพวก มักมีประจุเป็นลบ เนื่องจากมีหมู่ acidic sulfate บน polysaccharides ดังนั้น ยาที่มีโครงสร้างโมเลกุลเป็น Cationic จะสามารถจับกับหมู่ acidic sulfatc ในวุ้นได้มีผลทำให้การออกฤทธิ์ของยาลดลง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. *เชื้อที่นำมาทดสอบ* ขนาดของเชื้อที่นำมาทดสอบ มีผลต่อการทดสอบอย่างมาก โดยเฉพาะในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวในการทดสอบวิธี broth dilution test เช่น มีผลทดสอบความไวของเชื้อ *Pseudomonas sp* ต่อยา Carbenicillin ในตัว broth พบว่า ค่า MIC เพิ่มขึ้นจาก 5 เป็น 40 เท่า เมื่อใช้เชื้อเพิ่มขึ้นจาก 10^3 CFU/ml. เป็น 10^7 CFU/ml.

5. *บรรยากาศขณะบ่มเพาะ* โดยเฉพาะเมื่อใช้อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง (agar medium) ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของ pH ได้ค่อนข้างมาก เมื่อบ่มเพาะเชื้อที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ ทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อเกิดสภาวะกรดขึ้น

4. MIC ของ antibiotic และ antimicrobial บางชนิด

4.1 Oxytetracycline

ยากลุ่ม Tetracycline เป็นยาที่ผลิตขึ้นเพื่อให้ออกฤทธิ์วงกว้างทำลายเชื้อแบคทีเรียทั้งแกรมบวกและแกรมลบ ยาในกลุ่มนี้ผลิตขึ้นจากเชื้อราในตระกูล streptomyces.

ลักษณะเป็นผลึกสีเหลือง ไม่มีกลิ่นมีรสขมเล็กน้อย ละลายน้ำและสารอินทรีย์ได้ดี จะยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย ซึ่งพบว่าค่า MIC จะอยู่ที่ 0.025 – 100 μg/ml. จะสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *Vibrio sp.* ที่ทำให้เกิดโรคในกุ้งกุลาดำได้ ซึ่งพบว่าที่ความเข้มข้น 100 μg/ml. จะสามารถยับยั้งเชื้อได้มากที่สุดถึง 97 สายพันธุ์ (Ruangpan *et al.* 1995)

4.2 Quinolone

ยากลุ่มคริโนโลนมีตัวยาที่เป็นองค์ประกอบคือ Oxolinic acid และ Norfloxacin โดย Oxolinic acid จะยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย และฆ่าเชื้อแบคทีเรียทั้งแกรมบวกและแกรมลบ จะคงรูปอยู่ในน้ำได้นานตกตะกอนแล้วยังสามารถยับยั้งแบคทีเรียได้ จะทนต่อการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ

การใช้พบว่าจะมีการใช้ผสมกับอาหารในอัตราส่วน ตัวยา 24 มิลลิกรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม พบว่าค่า MIC จะอยู่ในช่วง 0.0125 – 100 μg/ml. ซึ่งสามารถยับยั้งแบคทีเรีย *Vibrio sp.* ในกุ้งกุลาดำ *(Peaneus monodon)* ซึ่งพบว่าที่ความเข้มข้น 100 μg/ml. สามารถจะยับยั้งเชื้อได้ 126 สายพันธุ์แล้วยังมีการนำกุ้งกุลาดำมาแยกเอาเชื้อแล้วนำมาทดสอบตามวิธี NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standard) พบว่าที่ความเข้มข้น 1.2 และ 37.5 μg/ml. จะสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ 50 % และ 90 % ตามลำดับ (Ruangpan *et al.* 1995) ส่วน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Norfloxacin พบว่ามีค่า MIC อยู่ในช่วง 0.0125 – 100 μg/ml. ที่ความเข้มระดับต่างๆจะสามารถยับยั้งเชื้อได้ต่างๆกัน ซึ่งจะมีค่าเหมือนกับ Oxolinic acid และที่ความเข้ม 9.45 และ 75 μg/ml. จะสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียได้ 50% และ 90 % วิธีการทดสอบจะใช้วิธีการของ NCCLS เช่นกัน โดยจะใช้เชื้อชนิดเดียวกับที่ใช้ทดสอบ Oxolinic acid และจากรายงานของ ศุภชัย (2538) กล่าวว่า ยากลุ่ม Quinolone จะทำให้แบคทีเรียเกิดการดื้อยา

4.3 Difloxacin และ Sarafloxacin

ยา 2 ชนิดนี้จัดเป็นยา ในกลุ่มซัลฟา จะมีลักษณะเป็นผงผลึกสีขาว ไม่ค่อยละลายน้ำ อยู่ในรูปเกลือ ในสารละลายที่เป็นกรดแก่และด่างแก่จะออกฤทธิ์ได้ดีที่ pH 4.78 – 8.56 ยาในกลุ่มนี้จะยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียมากกว่าที่จะฆ่าเชื้อแบคทีเรียโดยตรง รักษาโรคได้ดีในระยะเฉียบพลัน เพราะช่วงที่แบคทีเรียขยายขนาดใหญ่ขึ้นสารอาหารจากภายนอกเข้าไปในเซลล์แบคทีเรียได้ง่าย ยาจึงเข้าไปได้ง่าย ถ้าในระยะเรื้อรังจะไม่ค่อยได้ผล

พบว่าค่า MIC ของ Difloxacin มีค่า 400 mg/kg อาหาร จะยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* ในกุ้งกุลาดำ *(Penaeus vannamei)* แต่จะทำให้อาหารมีรสชาติไม่ถูกปาก กุ้งทำให้กุ้งไม่ค่อยกินอาหาร แต่ที่ความเข้มข้น 100 mg/kg อาหาร พบว่าไม่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้เท่าที่ควร แต่อาหารจะน่ากิน กุ้งยอมรับอาหารมากกว่า (Park *et al.* 1995)

4.4 Streptomycin

Streptomycin แยกได้จากเชื้อ *Streptomyces griseus* ซึ่งยานี้ออกฤทธิ์ทำลายแบคทีเรียแกรมลบได้ดี เช่น เชื้อ *Aeromonas hydrophila* ที่แยกได้จากปลาแต่ละท้องที่และยา Streptomycin ในรูปเบส และรูปเกลือของกรดอินทรีย์ จะละลายน้ำได้ดี ในปัจจุบันนิยมใช้ยา Streptomycin ในรูป Streptomycin sulfate เพราะละลายได้ดี ยา Streptomycin จะออกฤทธิ์ได้ดีในสารละลายที่เป็นด่างเล็กน้อยที่ pH 8 ยาจะออกฤทธิ์ทำลายเชื้อ grame – negative bacilli ได้ดีพบว่าค่า MIC จะอยู่ที่ 200 μg/ml. (เกรียงศักดิ์ และคณะ 2528)

4.5 Neomycin

ยา Neomycin เป็นยาในกลุ่ม Aminoglycoside แยกได้จากเชื้อ *Strepomyces fradiae* เป็นยาป้องกันเชื้อรา (anti – fungal compound) ยา neomycin เป็นสารประกอบ Polybasic

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ละลายในสารละลายอินทรีย์ ยานี้จะทนต่อความร้อนได้ดี มักจะ form เกลือกับกรดที่อุณหภูมิห้อง พบว่าค่า MIC ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Aeromonas hydrophila* ที่แยกได้จากปลาที่ป่วยเป็นโรคจะมีค่า อยู่ที่ 100 µg/ml. (เกรียงศักดิ์ และคณะ 2528)

4.6 Kanamycin

ยา Kanamycin เป็นยาปฏิชีวนะในกลุ่ม Aminoglycosids แยกได้จากเชื้อ *Streptomyces kanamyceticus* เป็นสารประกอบ polybasic จะละลายน้ำได้ดีคงทนมากที่ pH 2 – 11 เมื่อนำยาเข้า autoclave ที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง พบว่าฤทธิ์ในการทำลายเชื้อแบคทีเรียก็ยังคงอยู่ แต่ถ้ายาอยู่ในรูปสารละลายและถูกกับอากาศจะทำให้ยาเปลี่ยนเป็นสีดำประสิทธิภาพลดลง โดยทั่วไปที่ขายในท้องตลาดอยู่ในรูป Kanamycin sulfate. สามารถได้ออกฤทธิ์ทำลายเชื้อแบคทีเรียหลายชนิด โดย เชื้อ *Vibrio spp.* ที่แยกจากกุ้งกุลาดำพบว่ามีค่าการยับยั้งเชื้อ MIC อยู่ที่ 1.6 – 100 µg/ml. ซึ่งช่วงความเข้มข้นจะสามารถยับยั้งได้ต่างกันไป และพบว่าเชื้อสามารถดื้อต่อยานี้ได้มากที่สุด (Ruangpan *et al.* 1995) ยา Kanamycin จะออกฤทธิ์ยับยั้งการสร้างโปรตีน และ ทำลายเชื้อแบคทีเรียแกรมลบได้ดี ซึ่งเชื้อที่มีความไวต่อยา Kanamycin ได้แก่ *E. coli, Mycobacterinm, Salmonella และ Vibrio* เป็นต้น

5. MIC ของสารเคมีกลุ่ม Ammonium quaternary Compounds

5.1 Benzalkonium chloride (B.K.C.)

ลักษณะเป็นสารละลายใส หนืดคล้ายยาสระผมไม่มีกลิ่น ถ้ามีความเข้มข้นมากๆจะมีกลิ่นคล้ายผงซักฟอก ไม่มีอันตรายต่อสัตว์น้ำ และผู้ใช้ ไม่มีผลตกค้างสามารถออกฤทธิ์ฆ่าแบคทีเรียโดยจะทำลายผนังเซลล์ และขัดขวางขบวนการเมตาโบลิซึม ภายในเซลล์แบคทีเรีย ทำให้แบคทีเรียหยุดการเจริญเติบโต นอกจากนี้สามารถควบคุมปรสิตเซลล์เดียว มีผลต่อแพลงก์ตอน สามารถฆ่าแพลงก์ตอนได้ มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงคุณภาพน้ำน้อย

ค่า MIC ของ B.K.C. จะอยู่ในช่วง 16 – 64 µg/ml. ซึ่งจะสามารถยับยั้งเชื้อ *Vibrio alginolyticus, V. cholevae, V. harveyi และ V. parahaemolyticus.* ที่อยู่ในกุ้งกุลาดำ และสามารถออกฤทธิ์ในการควบคุมเชื้อ *Vibrio sp.* ได้ดีที่สุดที่ pH 9 และประสิทธิภาพของ B.K.C. จะลดลงเมื่อความเค็มสูงขึ้น (ปณรัตน์ และนนทวิทย์ 2539) นอกจากนั้นประสิทธิภาพของ B.K.C. ในสภาพน้ำ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ที่มีสารอินทรีย์จะอยู่ระหว่าง 32 – 128 μg/ml. ในขณะที่ไม่มีสารอินทรีย์ในน้ำ มีค่า MIC อยู่ในช่วง 2 – 8 μg/ml. เนื่องจาก B.K.C.จะสามารถทำปฏิกิริยากับสารอินทรีย์ ทำให้ส่วนที่เหลือออกฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อได้น้อยลง (ปณรัตน์ และนนทวิทย์ 2539)

6. ประสิทธิภาพของยาฆ่าเชื้อบางชนิดต่อเชื้อแบคทีเรีย

6.1 ยาฆ่าเชื้อในกลุ่ม Oxidixing agents.

6.1.1 ด่างทับทิม ($KMnO_4$)

ได้มีการศึกษาถึงประสิทธิภาพของด่างทับทิมต่อเชื้อ *A. hydrophila* ที่แยกได้ระหว่างที่มีการระบาดของโรคปลา จำนวน 15 สายพันธุ์ เชื้อส่วนใหญ่ พบว่าด่างทับทิมที่ความเข้มข้น 5 ppm. จะสามารถฆ่าเชื้อได้หมดภายในเวลา 60 นาที จำนวน 5 สายพันธุ์ และที่ความเข้มข้น 10 และ 20 ppm. จะสามารถฆ่าเชื้อได้หมดทุกสายพันธุ์ในเวลา 30 และ 15 นาที ตามลำดับ (เกรียงศักดิ์ และอรพิน. 2528) ซึ่งจากการทดลองของอรุณศรีและเกรียงศักดิ์ (2526) พบว่าประสิทธิภาพของด่างทับทิมในน้ำสะอาดความเข้มข้น 100 ppm. จะฆ่าเชื้อ *A. hydrophila* จำนวน $10^6 – 10^7$ CFU/ml. ได้หมดภายใน 1 นาที ส่วนที่ความเข้มข้น 50 ppm. สามารถทำลายเชื้อเหลือ 8×10^4 และ 9×10 (CFU/ml.) ภายใน 1 นาที และ 5 นาที ส่วนที่ความเข้มข้น 5 ppm. สามารถทำลายเชื้อนี้ลงเหลือ 3×10^6 , 1×10^7 , 7×10^5 , 1×10^4 และ 8×10 CFU/ml. ภายใน 1 , 5 , 15 , 50 และ 60 นาที ตามลำดับ แต่ด่างทับทิมความเข้มข้น 2.5 ppm. ไม่สามารถทำลายเชื้อได้หมดภายใน 120 นาที ส่วนในสภาพน้ำสกปรกพบว่าด่างทับทิมความเข้มข้น 1,000 ppm. ทำลายเชื้อจำนวน 10^6 - 10^7 ได้หมดภายใน 1 นาที ที่ความเข้มข้น 100 ppm. สามารถทำลายเชื้อนี้เหลือ 2 CFU/ml. ภายใน 1 นาที ที่ความเข้มข้น 50 ppm. สามารถทำลายเชื้อภายใน 15 นาที โดยเชื้อเหลือ 1×10^3 และ 10 CFU/ml. ภายใน 1 นาที และ 5 นาที แต่ด่างทับทิมที่ 5 ppm. ไม่สามารถทำลายเชื้อนี้ได้หมดภายใน 120 นาที โดยสามารถทำลายเชื้อนี้เหลือ 3×10^3 CFU/ml. ภายใน 1 นาที ดังนั้นในการฆ่าเชื้อในบ่อเลี้ยงปลาควรเพิ่มความเข้มข้นให้สูงกว่า 5 ppm. หรืออาจจะทำให้น้ำปราศจากสารอินทรีย์ก่อนในกรณีที่ไม่สามารถใช้ด่างทับทิมให้มีความเข้มข้นมากกว่านี้ เพราะถ้าใช้ด่างทับทิมมากเกินไปก็จะเป็นอันตรายเป็นพิษต่อปลาได้ ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองเยาวนิตย์และคณะ (2542) ที่พบว่า ด่างทับทิมที่มีความเข้มข้น 2 – 3 ppm. ในระดับความเค็ม 30 ppt. มีความเป็นพิษสามารถทำลายเยื่อบุผิวเหงือกปลาและพบว่าประสิทธิภาพของด่างทับทิมในการกำจัดเชื้อ *Flexibacter maritimas* ในน้ำทะเลความเค็ม 30 และ 15

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ppt. พบว่าน้ำทะเลระดับความเค็ม 30 ppt. ด่างทับทิมที่ความเข้มข้น 1, 2, และ 3 ppm. จะมีประสิทธิภาพในการกำจัดเชื้อ *Flexibacter maritimus* ได้ทุกระดับ ส่วนที่ความเค็ม 15 ppt. พบว่าด่างทับทิมที่ 2 และ 3 ppm. จะมีประสิทธิภาพดี ดังนั้นในการพิจารณาถึงประสิทธิภาพและความปลอดภัยในการใช้สารเคมีด่างทับทิมควรใช้ด่างทับทิมความเข้มข้น 2 – 3 ppm. นาน 10 นาที ในน้ำระดับความเค็มต่ำกว่า 15 ppt.

6.1.2 ไอโอดีน (Iodine)

ไอโอดีน เป็นสารพวก Halogen ที่เป็นสารแข็งสามารถกลายเป็น ไอระเหยได้โดยไม่ต้องกลายเป็นของเหลวก่อน เป็นยาฆ่าเชื้อที่สามารถทำลายเชื้อแบคทีเรีย, ไวรัส, รา และโปรโตซัว ประสิทธิภาพของไอโอดีนในสภาพน้ำสะอาดพบว่า ที่ความเข้มข้น 25, 12.5 และ 6.25 ppm. สามารถทำลายเชื้อ *A. hydophila* จำนวน $10^6 - 10^7$ CFU/ml. ได้หมดภายใน 1 นาที ส่วนไอโอดีนความเข้มข้น 1 ppm. สามารถลดจำนวนเชื้อลงเหลือ 2×10^2 CFU/ml. หลังจากนั้นจะเหลือเชื้ออยู่ 5×10^2, 2×10^2, 1×10^2, 6×10 และ 10 CFU/ml. ภายใน 5, 15, 30, 60 และ 120 นาที และไอโอดีนความเข้มข้น 0.1 ppm. สามารถทำลายเชื้อเหลือ 7×10^5 CFU/ml. ภายใน 1 นาที หลังจากนั้นจะเหลือเชื้ออยู่ 8×10^5, 6×10^5, 1×10^6, 5×10^6 และ 5×10^6 CFU/ml. ภายใน 5, 15, 60 และ 120 นาที ในสภาพน้ำสกปรกไอโอดีนความเข้มข้น 25 และ 12.5 ppm. สามารถทำลายเชื้อ *A. hydrophila* จำนวน $10^6 - 10^7$ CFU/ml. ได้หมดภายในเวลา 1 นาที และไอโอดีนความเข้มค้น 10 ppm. และ 8 ppm. สามารถทำลายเชื้อได้หมดภายในเวลา 1 นาที เช่นเดียวกันแต่ที่ความเข้มข้น 6.25, 1 และ 0.1 พบว่าไม่สามารถทำลายได้หมดภายในเวลา 120 นาที โดยที่ความเข้มข้น 6.25 ppm. สามารถทำลายเชื้อลงเหลือ 5×10^5 CFU/ml. ภายใน 1 นาที ซึ่งความเข้มข้น 1 และ 0.1 ppm. ไม่สามารถทำลายเชื้อนี้ได้เลยในเวลา 120 นาที (อรุณศรี และเกรียงศักดิ์, 2526) ซึ่งในการทดลองของเกรียงศักดิ์ และอรพิน (2528) กลับพบว่าไอโอดีนความเข้มข้น 1 ppm. สามารถฆ่าเชื้อ *A. hydrophila* ได้หมดภายในเวลา 60 นาที จำนวน 3 สายพันธุ์ และที่ความเข้มข้น 2 และ4 ppm. จะสามารถฆ่าเชื้อได้หมดภายในเวลา 2 นาที 30 วินาที จำนวน 11 และ 13 สายพันธุ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

6.2 ยาฆ่าเชื้อในกลุ่ม Phenolics.

6.2.1 Phenol

ประสิทธิภาพของ Phenol 0.8 % สามารถฆ่าเชื้อ *A. hydrophila* ได้ทั้งหมด จำนวน 15 สายพันธุ์ ได้ภายในเวลา 2 นาที 30 วินาที ส่วนที่ความเข้มข้น 0.4 % ฆ่าเชื้อได้หมด จำนวน 8 สายพันธุ์ ภายในเวลา 15 นาที และไม่สามารถฆ่าเชื้อได้เลยที่ 0.2 % ในสภาพน้ำสะอาดที่อุณหภูมิ 28 ± 1 องศาเซลเซียสเซลเซียส ความเป็นกรด - ด่าง 7.2 (เกรียงศักดิ์และอรพิน. 2528)

6.3 ยาฆ่าเชื้อกลุ่ม Ammonium quaternary compounds

6.3.1 Benzal konium chloride

ประสิทธิภาพของ B.K.C. ในสภาพน้ำสะอาด pH 7.2 น้ำมีอุณหภูมิ 28 ± 1 องศาเซลเซียส พบว่าความเข้มข้น 0.05 % จะฆ่าเชื้อ *A. hydrophila* นี้ได้ทั้งหมด 15 สายพันธุ์ ภายในเวลา 2 นาที 30 วินาที ส่วนความเข้มข้น 0.005 % และ 0.0005 % จะฆ่าเชื้อได้ทั้งหมด จำนวน 11 และ 2 สายพันธุ์ ในเวลา 5 และ 60 นาที ตามลำดับ (เกรียงศักดิ์และอรพิน. 2528)

6.3.2 Cetyl Pyridinium Chloride

พบว่าประสิทธิภาพของ Cetyl Pyridinium Chloride ที่ความเข้มข้น 0.01 % และ 0.005 % จะฆ่าเชื้อ *A. hydrophila* ได้ทั้งหมด 15 สายพันธุ์ ภายในเวลา 2 นาที 30 วินาที ส่วนความเข้มข้นที่ 0.0025 % จะฆ่าเชื้อได้ทั้งหมด 15 สายพันธุ์ ใช้เวลา 30 นาที (เกรียงศักดิ์และอรพิน. 2528)

6.4 ยาฆ่าเชื้อกลุ่ม Heavy metal

6.4.1 Copper Sulpate ($CuSO_4$)

ประสิทธิภาพของ $CuSO_4$ ที่ความเข้มข้น 200 , 100 และ 50 ppm. สามารถฆ่าเชื้อได้หมดในระยะเวลา 5 , 15 และ 30 นาทีได้ 14 , 6 และ 8 เมตร ในสภาพน้ำสะอาด ซึ่ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เยาวนิตย์และคณะ (2542) ก็ได้พบว่าประสิทธิภาพของจุนสีในการกำจัดเชื้อ *Flexibacter maritimus* ในน้ำทะเลความเค็ม 30 และ 15 ppt. พบว่าน้ำทะเลระดับความเค็ม 30 ppt. จุนสีที่ความเข้มข้น 6.8 และ 10 ppm. จะมีประสิทธิภาพในการกำจัดเชื้อได้ดีทุกระดับส่วนที่ความเค็ม 15 ppt. พบว่าจุนสีที่ความเข้มข้น 6.8 และ 10 ppm. จะมีประสิทธิภาพดี ซึ่งในการศึกษาถึงความเป็นพิษต่อปลา พบว่า จุนสีที่ความเข้มข้น 6.8 และ 10 ppm. ในน้ำทะเล 15 และ 30 ppt. จะไม่เป็นพิษต่อปลา

6.5 ยาฆ่าเชื้อกลุ่ม Dyes.

6.5.1 Acriflavin

ประสิทธิภาพของ Acriflavin ในน้ำสะอาดพบว่าที่ความเข้มข้น 500, 250 และ 175 ppm. (0.05 , 0.025 และ 0.0175%) สามารถฆ่าเชื้อ *A. hydrophila* ได้หมดทุกสายพันธุ์ต้องใช้เวลา 2 นาที 30 วินาที 5 และ 30 นาที (เกรียงศักดิ์และอรพิน. 2528)

6.5.2 Methylene Blue

พบว่าที่ความเข้มข้น 800 ppm. สามารถฆ่าเชื้อ *A. hydrophila* ได้หมดทุกสายพันธุ์ในเวลา 30 นาที ในสภาพน้ำสะอาด ส่วนที่ความเข้มข้น 400 และ 200 ppm. จะสามารถฆ่าเชื้อได้หมดจำนวน 14 และ 13 สายพันธุ์ ภายในเวลา 60 นาที (เกรียงศักดิ์และอรพิน. 2528)

6.5.3 Malachite green

พบว่าที่ความเข้มข้น 40 , 20 และ 10 ppm. จะฆ่าเชื้อ *A. hydrophila* ได้จำนวน 13 , 10 และ 5 สายพันธุ์ในเวลา 60 นาทีในสภาพน้ำสะอาด (เกรียงศักดิ์และอรพิน. 2528)

6.5.4 Crystal Violet

ประสิทธิภาพของ Crystal Violet ที่ความเข้มข้น 400 และ 200 ppm. (0.04 และ 0.02%) จะฆ่าเชื้อได้หมดทุกสายพันธุ์ในเวลา 15 และ 30 นาที และที่ความเข้มข้น 100 ppm. จะฆ่าเชื้อได้ 12 สายพันธุ์ภายในเวลา 30 นาที ในสภาพน้ำสะอาด (เกรียงศักดิ์และอรพิน. 2528)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. Pipett ขนาด 1ml., 5ml., 10ml.
2. Micropipett ขนาด 100 และ 1,000 ไมโครลิตร
3. แท่งแก้ว 3 ขาสำหรับ Speard plate
4. Plate
5. หลอดทดลองขนาดใหญ่
6. หลอดทดลองขนาดเล็ก
7. บีกเกอร์ขนาด 250ml., 500ml., และ 1,000 ml.
8. แท่งแก้วคนสาร
9. เครื่องชั่งสาร
10. Vortex mixture
11. หลอดเหวี่ยงและเครื่อง centifuge อุณหภูมิต่ำ รุ่น universal 16 R
12. ตะเกียงแอลกอฮอล์
13. loop และ needle
14. เครื่อง Spectrophotometer รุ่น Spectronic 401
15. ตู้บ่มเชื้อ
16. ตู้อบหม้อนึ่งฆ่าเชื้อ
17. ตู้อบความร้อน
18. Flask
19. Cylinder
20. ฟรอยด์
21. สำลี
22. Rack
23. Nutrient broth
24. Agar
25. Nacl
26. ยาเหลือง Acriflavin
27. น้ำกลั่น
28. แอลกอฮอล์ 70%

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วิธีการ

1. แผนการทดลอง

ในการศึกษาครั้งนี้จะแบ่งออกเป็น 3 ขั้นตอนตามลำดับคือ

1.1 การทำกราฟมาตรฐานของเชื้อแบคทีเรียแต่ละชนิด

1.2 ขั้นตอนการทดสอบหาค่า MIC

1.3 ขั้นตอนการทดสอบประสิทธิภาพของยาเหลือง (Acriflavin)

ในขั้นตอนทั้ง 3 ขั้นตอนจะอธิบายในรายละเอียดดังนี้

1.1 *การทำกราฟมาตรฐาน (Standard curve) ของเชื้อแบคทีเรีย*

1.1.1 เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียในอาหารเหลวแล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 18 – 24 ชั่วโมง

1.1.2 นำสารละลายเชื้อแบคทีเรียเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,000 รอบ นาน 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 – 5 องศาเซลเซียส

1.1.3 เทอาหารส่วนบนทิ้งและล้างด้วยน้ำเกลือ 0.85% ทำการล้างเซลล์ทั้งหมด 2 ครั้ง

1.1.4 เติมน้ำเกลือลงไปแล้วทำการ Mix ด้วยเครื่องปั่นแล้วนำไปวัดค่า OD (Optical Density) ที่ความยาวคลื่น 540 nm.

1.1.5 นำเชื้อแบคทีเรียที่ทราบค่า OD แล้วมาทำการกำหนดค่า OD ที่ระดับต่างๆ ด้วยสูตร $N_1V_1 = N_2V_2$ โดยใช้น้ำเกลือ 0.85% เป็นตัวเจือจาง

1.1.6 นำค่า OD ทุกระดับมาทำการเจือจางแบบ 10 เท่า และนำ 3 ความเข้มข้นสุดท้ายไปทำการนับจำนวนเซลล์ที่ความเข้มข้นละ 2 ซ้ำ โดยการ Speard plate (ดังภาพผนวกที่ 2)

1.1.7 นำ plate ไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 18 – 24 ชั่วโมง นับจำนวนเซลล์ (Colony) ที่ได้

1.1.8 นำข้อมูลที่ได้ไปเขียนกราฟสมการเส้นตรงระหว่าง log จำนวนเซลล์แบคทีเรียกับค่า OD ที่ระดับต่างๆ

<u>หมายเหตุ</u> การเจือจางเมื่อดูดเชื้อ 1 ml. + น้ำเกลือ 9 ml. แล้วให้เปลี่ยน pipett อันใหม่ทำการ Mix ให้ดีก่อนดูด 1 ml. ไปทำการเจือจางต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
39294

1.2 ขั้นตอนการทดสอบ MIC ของยา Acriflavin ต่อเชื้อ Aeromonas hydrophila และ Pseudomonas fluorescence ตามวิธีการของ NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards. 1991)

1.2.1 การเตรียมความเข้มข้นของยา

1.2.1.1 ยาที่ใช้เป็นยาเหลืองของบริษัท วิทยาศรม จำกัด ประกอบด้วย 1 : 500 g/ml. คิดเป็นความเข้มข้น 2,000 ppm.

1.2.1.2 เตรียมความเข้มข้นของยาจาก stock ที่ความเข้มข้นต่างๆ ตามที่ต้องการในอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutreint Broth

1.2.1.3 เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวใส่หลอดแก้วหลอดละ 1 ml. แล้วดูดยาจาก Stock ที่เตรียมมา 1 ml. ใส่ลงใน Nutreint Broth ที่เตรียมไว้จะได้ความเข้มข้นของยาลดลงครึ่งหนึ่งแล้วทำการเจือจางความเข้มข้นของยาแบบ 2 เท่า two – fold ต่อไปจะได้ระดับความเข้มข้นต่ำสุด (1,000 → 500 → 250 → 125 → 62.5 ppm.)

1.2.2 การทดสอบค่า MIC ของเชื้อ *Aeromonas hydrophila* และ *Pseudomonas fluorescence*

1.2.2.1 ทำการเลี้ยงเชื้อ *A. hydrophila* และ *P. fluorescence* ในอาหารเหลวบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส 18 – 24 ชั่วโมง

1.2.2.2 นำเชื้อไปเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,000 รอบ นาน 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 – 5 องศาเซลเซียส

1.2.2.3 เทอาหารส่วนบนแล้วล่างด้วย Nutreint Broth แล้วทำการเหวี่ยง (ทำการล้างเซลล์ 2 ครั้ง)

1.2.2.4 เติม Nutreint Broth ลงไปแล้วนำไปวัดค่า OD ด้วยเครื่อง Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 540 nm. เพื่อต้องการทราบจำนวนเซลล์เริ่มต้น (ใช้ NB เป็น Blank วัดค่า OD)

1.2.2.5 เตรียมเชื้อ *A. hydrophila* และ *P. fluorescence* ให้มีจำนวนเซลล์เริ่มต้น 10^6 CFU/ml. ปริมาตร 15 – 20 ml.

1.2.2.6 ดูดเชื้อที่มีเซลล์ 10^6 CFU/ml. มา 1 ml. ใส่ลงในอาหารเหลวที่มีความเข้มข้นของยาระดับต่างๆ ที่มีปริมาตร 1 ml. จะทำให้ความเข้มข้นของยาลดลงครึ่งหนึ่ง และมีปริมาตรเชื้อ 10^5 CFU/ml. ส่วนในหลอด control จะไม่ใส่ยา การทดลองจะทำ 2 ซ้ำ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.2.2.7 ส่วนในหลอด control จะดูดมา 0.5 ml. ใส่ในอาหารเหลว 0.5 ml. ผสมให้เข้ากันแล้วใช้ pipett ดูดมา 0.01 ml.. ทำการ speard plate เพื่อนับจำนวนเซลล์เริ่มต้น

1.2.2.8 นำหลอดทั้งหมดบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 18 – 24 ชั่วโมง

1.2.2.9 สังเกตดูความขุ่นนำ 3 หลอดแรกที่ไม่มีความขุ่นเกิดขึ้นไป speard plate แล้วนำไปบ่มเพื่อนับจำนวนแบคทีเรียที่เหลือเพื่อหาค่า MIC (Minimum Inhibitory Concentration)

1.2.2.10 ความเข้มข้นที่มีเชื้อแบคทีเรียขั้นน้อยที่สุด คือค่า MIC ส่วนความเข้มข้นที่เชื้อแบคทีเรียไม่ขึ้นเลย คือค่า MBC (Minimum Bactericidal Concentration)

1.3 ขั้นตอนการทดสอบประสิทธิภาพของยาเหลือง Acriflavin ต่อเชื้อ Aeromanas hydrophila และ Pseudomonas fluorescence

1.3.1 การทดสอบในน้ำที่มีอินทรีย์สาร

1.3.1.1 เตรียมเชื้อ *A. hydrophila* และ *P. fluorescence* ให้มีระดับความเข้มข้น $10^6 - 10^7$ CFU/ml.

1.3.1.2 นำน้ำที่มีอินทรีย์สารเป็นองค์ประกอบได้จากบ่อเลี้ยงกบ (ภาควิชาวิทยาศาสตร์การประมง) ขนาด 2.5 × 2.0 เมตร มีกบประมาณ 85 ตัวให้อาหารสำเร็จรูปโปรตีน 30% มีการเปลี่ยนถ่ายน้ำสัปดาห์ละ 1 ครั้ง ใส่ขวดน้ำเกลือ 900 ml. ใน Control และ 800 ml. ในกลุ่มทดลองแล้วทำการฆ่าเชื้อใน autoclave

1.3.1.3 นำเชื้อที่เตรียมไว้ที่มีจำนวนเซลล์เริ่มต้น $10^6 - 10^7$ CFU/ml. ใส่ลงไปในน้ำฆ่าเชื้อแล้ว 100 ml. แล้วทำการ mix ให้เข้ากัน

1.3.1.4 นำยาที่เตรียมไว้ที่ความเข้มข้น 1500 ppm. จำนวน 100 ml. ใส่ลงในขวดน้ำเกลือกลุ่มทดลองที่มีน้ำที่มีอินทรีย์สารและเชื้อแบคทีเรียอยู่ ซึ่งจะได้ปริมาณความเข้มข้นของยาเหลือง 15 ppm.

1.3.1.5 หลังจากนั้นทำการจับเวลาที่ 15 , 30 , 60 นาที , 2 , 4 , 8 , 24 ชั่วโมง เมื่อถึงเวลาที่กำหนดใช้ micropipett ดูดส่วนผสมออกมา 1 ml. แล้วทำการเจือจาง แบบ 10 เท่าด้วยน้ำเกลือ 0.85 % จนถึงระดับ 10^7 แล้วดูดมา 0.1 ml. เพื่อทำการ spread plate ในทุกระดับ ณ เวลาต่างๆ แล้วทำการจดบันทึกระหว่างระยะเวลากับจำนวนโคโลนีของแบคทีเรีย

1.3.1.6 นำข้อมูลมาทำการวิเคราะห์ผล โดยการเขียนกราฟความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนเซลล์แบคทีเรียที่เหลืออยู่กับระยะเวลาต่างๆ

1.3.1.7 ส่วนการทดสอบประสิทธิภาพในน้ำสะอาดก็ทำเช่นเดียวกันกับน้ำที่มีอินทรีย์สาร แต่จะใช้น้ำกลั่นแล้วนำมาฆ่าเชื้อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การวิเคราะห์ข้อมูล

1 ใช้โปรแกรม Data Analysis ในส่วน Regression หาสมการเส้นตรงของจำนวนเชื้อแบคทีเรีย (Standard Curve)

2 ประสิทธิภาพของยาเหลืองจะทำการเขียนกราฟความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนเซลล์แบคทีเรียที่เหลือกับระยะเวลาที่ทำการทดลอง

สถานที่ทดลอง

ภาควิชาวิทยาศาสตร์การประมง คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ระยะเวลาทำการทดลอง

เดือนกันยายน – เดือนธันวาคม พ.ศ. 2542

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

17051

ผลการทดลอง

1. การทำกราฟมาตรฐาน

จากการทดลองได้มีการทำ Standard curve ของเชื้อแบคทีเรีย *A. hydrophila* และเชื้อ *P. fluorescence* หาความสัมพันธ์ระหว่างค่า OD (Optical Density) กับจำนวนเซลล์แบคทีเรีย (CFU/ml.) ผลดังแสดงใน ตารางที่ 1 และ 2 ซึ่งจากการวิเคราะห์ Regression จะได้

สมการเส้นตรงของเชื้อ *A. hydrophila* คือ $y = 1.2218 (x) + 7.305$

สมการเส้นตรงของเชื้อ *P. fluorescence* คือ $y = 1.4588 (x) + 6.546$

2. ค่า MIC ของ Acriflavin

จากการทดลองตามวิธีการของ NCCLS (National Committee to Clinical Laboratory Standard) พบว่าค่า MIC ของ Acriflavin ต่อเชื้อ *Aeromonas hydrophila* มีค่า 125 ppm. สามารถยับยั้งเชื้อที่มีจำนวนเซลล์เริ่มต้น 2.1×10^6 CFU/ml. (ค่า OD ~ 0.107) เมื่อสิ้นสุดการทดลองมีเชื้อแบคทีเรียเหลืออยู่ 3.75×10 CFU/ml. ส่วนค่า MIC ของ Acriflavin ต่อเชื้อ *Pseudomonas fluorescence* มีค่าเท่ากับ 150 ppm. จะสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *Pseudomanas fluorescence* ที่มีจำนวนเซลล์เริ่มต้นเท่ากับ 1.056×10^6 CFU/ml. (มีค่า OD ~ 0.08) เชื้อจะเหลืออยู่ 5.65×10 CFU/ml. เมื่อสิ้นสุดการทดลอง

3. ประสิทธิภาพของ Acriflavin ต่อเชื้อ *A. hydrophila* และ *P. fluorescence*

3.1 เชื้อ Aeromonas hydrophila

<u>ในน้ำสะอาด</u>

ในการทดลองเชื้อ *A. hydrophila* มีจำนวนเชื้อเริ่มต้น 1×10^7 CFU/ml. พบว่า Acriflavin ที่ความเข้มข้น 15 ppm. จะสามารถกำจัดเชื้อแบคทีเรียได้โดยพบว่าเชื้อคงเหลือ 1.35×10^6, 8.55×10^5, 4.2×10^5, 2.44×10^5, 5.4×10^4, 8×10^3 และ 6×10^3 CFU/ml. ภายในเวลา 15, 30, 60 นาที 2, 4, 8 และ 24 ชั่วโมง ตามลำดับ ซึ่งที่เวลา 8 ชั่วโมง Acriflavin จะมีประสิทธิภาพดีในการกำจัดเชื้อแบคทีเรียได้มากที่สุด และที่ 24 ชั่วโมง จะมีเชื้อแบคทีเรียจะเหลือน้อยที่สุดคือ 6×10^3 CFU/ml. ดังภาพที่ 1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ห้องสมุดคณะเทคโนโลยีการเกษตร
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าฯ ลาดกระบัง

ในน้ำที่มีอินทรีย์สาร

พบว่า Acriflavine ที่ความเข้มข้น 15 ppm. สามารถฆ่าเชื้อ *A. hydrophila* ที่มีจำนวนเซลล์เริ่มต้น 1×10^7 CFU/ml. ได้คงเหลือ 2.5×10^2 CFU/ml. ภายในเวลา 15 นาที หลังจากนั้น เชื้อ *A. hydrophila* จะตายหมด (ตารางที่ 4 และภาพที่ 3)

จากการทดลองได้มีการวัดคุณภาพน้ำ พบว่า

ในน้ำสะอาดอุณหภูมิ 23.5 องศาเซลเซียสเมื่อใส่ Acriflavin จะมีอุณหภูมิ 23.8 องศาเซลเซียส

pH 7.26 เมื่อใส่ Acriflavin จะมี pH 7.01

ในน้ำที่มีอินทรีย์สารอุณหภูมิ 24 องศาเซลเซียสเมื่อใส่ Acriflavin จะมีอุณหภูมิ 24 องศาเซลเซียส

pH 9.54 เมื่อใส่ Acriflavin จะมี pH 9.78

3.2 เชื้อ Pseudomonas fluorescence

ในน้ำสะอาด

ในการทดลองเชื้อ *P. fluorescence* มีจำนวนเชื้อเริ่มต้น 1×10^7 CFU/ml. พบว่า Acriflavin ที่ความเข้มข้น 15 ppm. จะสามารถกำจัดเชื้อแบคทีเรียได้ โดยพบเชื้อเหลือ 2.595×10^5 6.9×10^4, 1.5×10^5 และ 1.1250×10^2 CFU/ml. ภายในเวลา 15, 30, 60 นาที และ 2 ชั่วโมง ตามลำดับ ส่วนที่เวลา 4, 8 และ 24 ชั่วโมง Acriflavin จะสามารถกำจัดเชื้อแบคทีเรียได้หมด (ตารางที่ 5 และภาพที่ 4) ซึ่งพบว่าที่เวลา 4 ชั่วโมง เป็นต้นไป Acriflavin จะมีประสิทธิภาพในการกำจัดเชื้อ *P. fluorescence* ได้ดีที่สุด

ในน้ำที่มีอินทรีย์สาร

Acriflavin ที่ความเข้มข้น 15 ppm. จะสามารถกำจัดเชื้อ *P. fluorescence* ได้โดยพบว่ามีเชื้อคงเหลืออยู่ 3.25×10^5, 2.68×10^5, 2.215×10^5, 2.115×10^5, 6.875×10^5, 7.95×10^5 และ 4.525×10^5 ภายในเวลา 15, 30, 60 นาที 2, 4, 8 และ 24 ชั่วโมง ตามลำดับ (ตารางที่ 6 และภาพที่ 4) พบว่าประสิทธิภาพของ Acriflavin ความเข้มข้น 15 ppm. จะสามารถกำจัดเชื้อแบคทีเรียได้มากที่สุดที่เวลา 2 ชั่วโมง โดยมีเชื้อคงเหลือ 2.115×10^5 CFU/ml. หลังจากนั้นประสิทธิภาพของ Acriflavin จะลดลง หรือแบคทีเรียอาจมีการดื้อยาเกิดขึ้น (พจนีย์, 2537)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากการทดลองได้มีการวิเคราะห์คุณภาพน้ำ พบว่า

ในน้ำสะอาดอุณหภูมิ 24 องศาเซลเซียสเมื่อใส่ Acriflavin จะมีอุณหภูมิ 23.9 องศาเซลเซียส

pH 7.26 เมื่อใส่ Acriflavin จะมี pH 7.12

ในน้ำที่มีอินทรีย์สาร อุณหภูมิ 24องศาเซลเซียสเมื่อใส่ Acriflavin จะมีอุณหภูมิ 24 องศาเซลเซียส

pH 9.17 เมื่อใส่ Acriflavin จะมี pH 9.04

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 1 จำนวนเชื้อแบคทีเรีย *Aeromonas hydrophila* (CFU/ml.) ที่ระดับ OD (Optical Density) ต่างๆ

	ค่า OD (Optical Dansity) ที่ความยาวคลื่น 540 nm.						
	0.120	**0.203**	**0.350**	**0.469**	**0.59**	**0.803**	**0.909**
จำนวนเซลล์แบคทีเรีย(CFU/ml.)							
A. hydrophila	2.02×10^{7}	3.30×10^{7}	4.60×10^{7}	8.15×10^{7}	1.38×10^{8}	1.30×10^{7}	3.00×10^{8}
(ค่า log of cell bactcria)	(7.3050)	(7.5185)	(7.6901)	(7.9110)	(8.1390)	(8.1100)	(8.4770)

ตารางที่ 2 จำนวนเชื้อแบคทีเรีย *Pseudomonas fluorescence* (CFU/ml.) ที่ระดับ OD (Optical Density) ต่างๆ

	ค่า OD (Optical Dansity) ที่ความยาวคลื่น 540 nm.						
	0.171	**0.269**	**0.349**	**0.427**	**0.528**	**0.659**	**0.733**
จำนวนเซลล์แบคทีเรีย (CUF/ml.)							
P. fluorcsconce	3.520×10^{6}	1.255×10^{7}	1.970×10^{7}	3.150×10^{7}	3.700×10^{8}	3.700×10^{7}	8.450×10^{8}
(ค่า log of cell bacteria)	(6.5460)	(7.0980)	(7.2940)	(7.4980)	(7.5680)	(7.5680)	(7.9260)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3 จำนวนแบคทีเรีย *A. hydrophila* ที่เหลือรอดในช่วงเวลาต่างๆ หลังจากสัมผัสกับสารละลาย Acriflavin ความเข้มข้น 15 ppm. ในน้ำสะอาด

น้ำสะอาด (T_1)	จำนวนแบคทีเรีย *A. hydrophila* (CFU/ml.)						
	15 min	**30 min**	**60 min**	**2 hr**	**4 hr**	**8 hr**	**24 hr**
Control	1.33×10^{7}	7.10×10^{6}	1.30×10^{7}	9.90×10^{6}	1.20×10^{7}	1.58×10^{7}	1.17×10^{7}
	(7.1238)	(6.8512)	(7.1139)	(6.9956)	(7.0791)	(7.1986)	(7.6681)
T_1R_1	1.23×10^{7}	1.07×10^{7}	4.70×10^{6}	2.54×10^{6}	4.60×10^{5}	6.90×10^{4}	9.30×10^{4}
	(7.0899)	(7.0293)	(6.6721)	(6.4048)	(5.6627)	(4.8388)	(4.9684)
T_1R_2	8.40×10^{6}	6.40×10^{6}	3.70×10^{6}	2.34×10^{6}	6.20×10^{5}	9.10×10^{4}	2.70×10^{3}
	(6.9242)	(6.8061)	(6.5682)	(6.3692)	(5.7923)	(4.9590)	(3.4313)
ค่าเฉลี่ย	1.035×10^{6}	8.550×10^{6}	4.200×10^{6}	2.440×10^{4}	5.440×10^{5}	8.000×10^{4}	6.000×10^{4}
$(T_1R_1+T_1R_2)/2$	(6.0149)	(6.9319)	(6.6232)	(4.3873)	(5.7323)	(4.9030)	(4.7781)

ตารางที่ 4 จำนวนแบคทีเรีย *A. hydrophila* ที่เหลือรอดในช่วงเวลาต่างๆ หลังจากสัมผัสกับสารละลาย Acriflavin ความเข้มข้น 15 ppm. ในน้ำที่มีอินทรีย์สาร

น้ำที่มีอินทรีย์สาร (T_2)	จำนวนแบคทีเรีย *A. hydrophila* (CFU/ml.)						
	15 min	**30 min**	**60 min**	**2 hr**	**4 hr**	**8 hr**	**24 hr**
Control	1.29×10^{6}	1.41×10^{6}	1.05×10^{6}	8.30×10^{5}	1.31×10^{7}	2.50×10^{6}	1.17×10^{6}
	(6.1105)	(6.1492)	(6.0211)	(5.9191)	(6.1172)	(6.3979)	(6.0681)
T_2R_1	3.00×10^{2}	0	0	0	0	0	0
	(2.4771)						
T_2R_2	2.00×10^{2}	0	0	0	0	0	0
	(2.3010)						
ค่าเฉลี่ย	2.50×10^{2}	0	0	0	0	0	0
$(T_1R_1+T_1R_2)/2$	(2.3979)						

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 5 จำนวนแบคทีเรีย *P. fluorescence* ที่เหลือรอดในช่วงเวลาต่างๆ หลังจากสัมผัสกับสารละลาย Acriflavin ความเข้มข้น 15 ppm. ในน้ำสะอาด

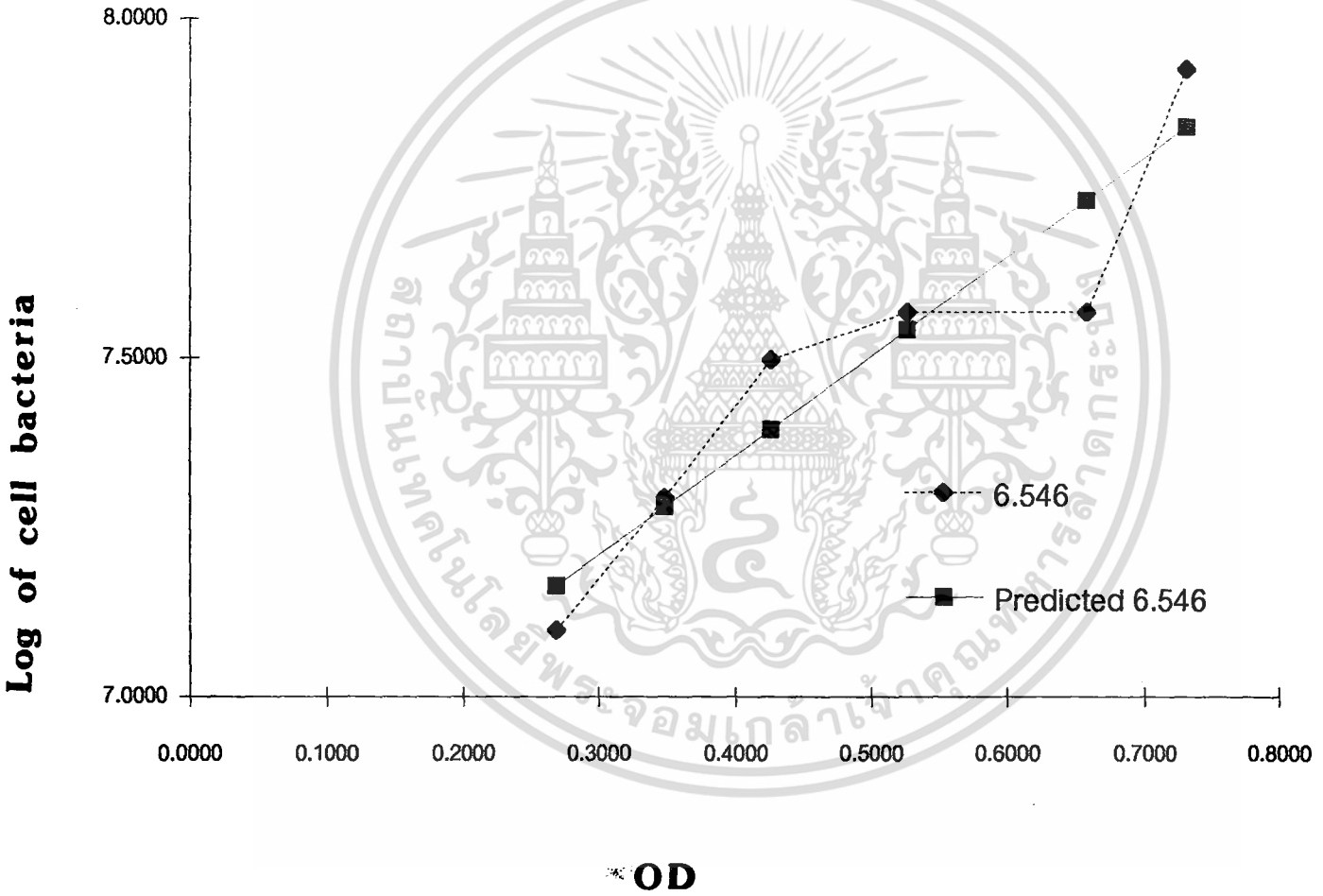
น้ำสะอาด (T_1)	จำนวนแบคทีเรีย *P. fluorescence* (CFU/ml.)						
	15 min	**30 min**	**60 min**	**2 hr**	**4 hr**	**8 hr**	**24 hr**
Control	2.95×10^{6}	2.99×10^{6}	2.30×10^{6}	5.60×10^{5}	1.11×10^{6}	7.30×10^{5}	9.80×10^{5}
	(6.4698)	(6.4756)	(6.3765)	(5.7481)	(6.6453)	(5.8633)	(5.9912)
T_3R_1	1.13×10^{5}	3.50×10^{4}	1.00×10^{3}	2.80×10^{3}	0	0	0
	(5.0530)	(4.5440)	(3.0000)	(4.4471)			
T_3R_2	4.06×10^{5}	1.03×10^{5}	2.99×10^{5}	1.97×10^{4}	0	0	0
	(5.6085)	(5.0128)	(5.4756)	(4.2944)			
ค่าเฉลี่ย	2.595×10^{4}	6.900×10^{3}	1.500×10^{4}	1.125×10^{3}	0	0	0
$(T_3R_1+T_3R_2)/2$	(1.4140)	(0.8380)	(1.1760)	(0.0511)			

ตารางที่ 6 จำนวนแบคทีเรีย *P. fluorescence* ที่เหลือรอดในช่วงเวลาต่างๆ หลังจากสัมผัสกับสารละลาย Acriflavin ความเข้มข้น 15 ppm. ในน้ำที่มีอินทรีย์สาร

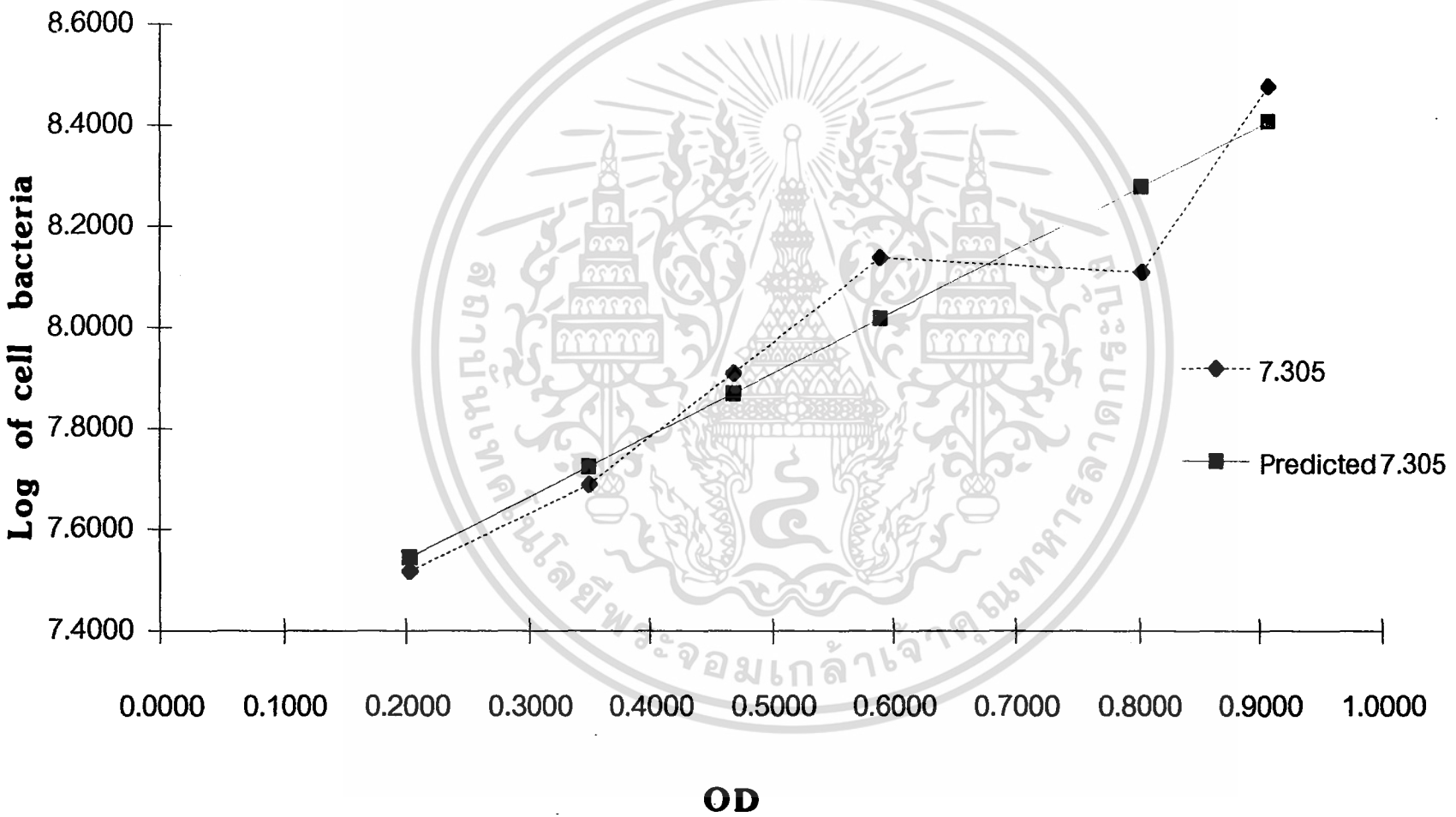
น้ำที่มีอินทรีย์สาร	จำนวนแบคทีเรีย P. fluorescence (CFU/ml.)						
(T_4)	**15 min**	**30 min**	**60 min**	**2 hr**	**4 hr**	**8 hr**	**24 hr**
Control	1.34×10^{6}	8.70×10^{5}	1.78×10^{6}	4.30×10^{5}	8.30×10^{5}	2.22×10^{6}	2.59×10^{3}
	(6.4698)	(5.9395)	(6.2504)	(6.6334)	(5.9191)	(6.3463)	(7.4132)
T_4R_1	3.60×10^{5}	9.60×10^{4}	1.67×10^{5}	2.89×10^{5}	2.75×10^{5}	5.90×10^{5}	1.55×10^{7}
	(5.5563)	(4.9822)	(5.2227)	(5.4608)	(5.4393)	(5.7708)	(7.1903)
T_4R_2	2.90×10^{5}	4.40×10^{5}	2.76×10^{5}	1.34×10^{5}	1.10×10^{6}	1.00×10^{5}	7.50×10^{7}
	(5.4623)	(5.6434)	(5.4409)	(5.1271)	(6.0413)	(5.0000)	(7.8751)
ค่าเฉลี่ย	3.250×10^{5}	2.680×10^{5}	2.215×10^{5}	2.115×10^{5}	6.875×10^{5}	7.950×10^{5}	4.525×10^{7}
$(T_4R_1+T_4R_2)/2$	(1.5120)	(1.4280)	(1.3450)	(1.3150)	(1.2840)	(1.4770)	(3.0600)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

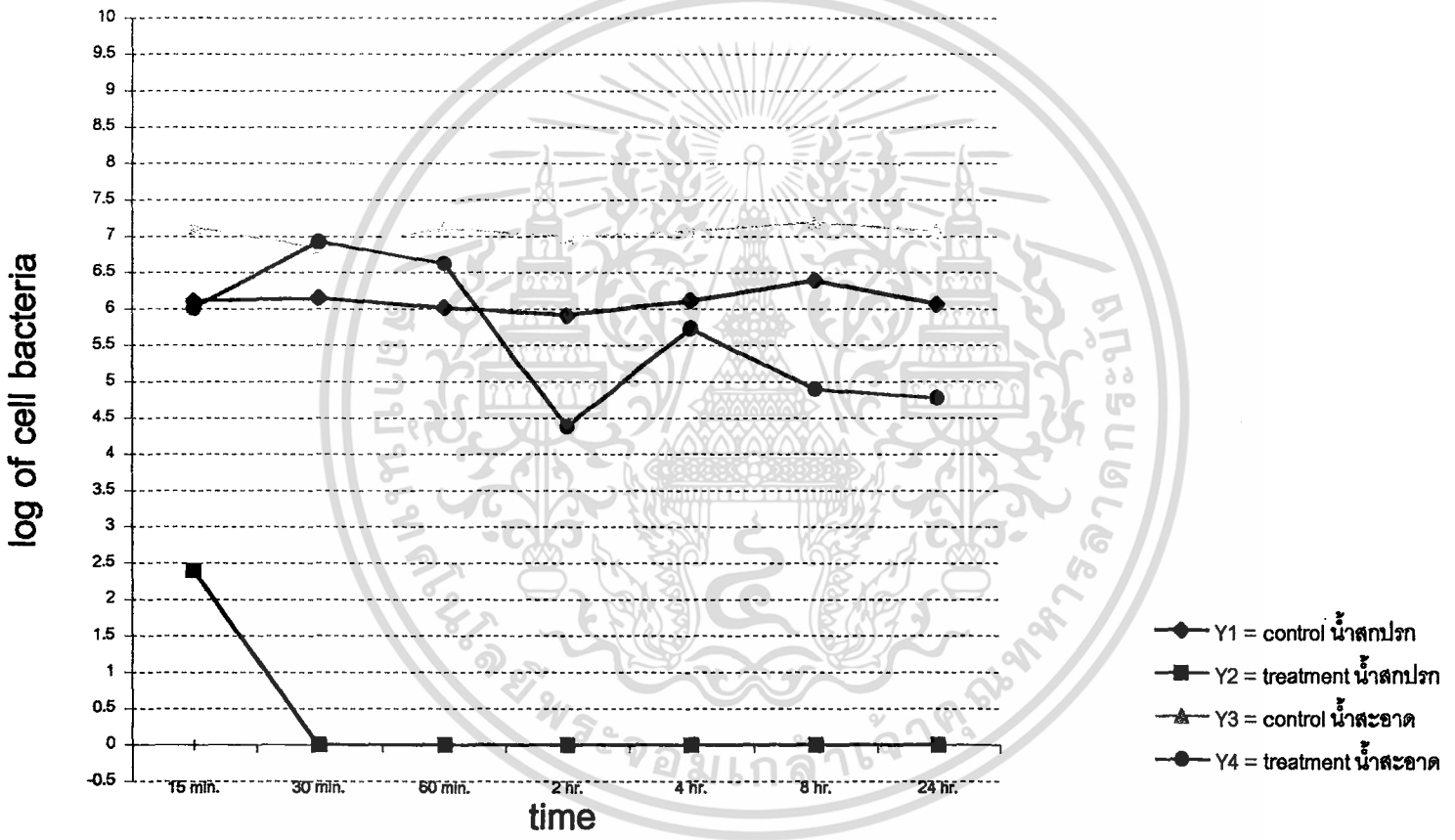
ภาพที่ 1 ความสัมพันธ์ระหว่างค่า Optical Density (OD) กับจำนวนเชื้อแบคทีเรีย *Pseudomonas fluorescence* ที่ 24 ชั่วโมง อุณหภูมิ 30 °C



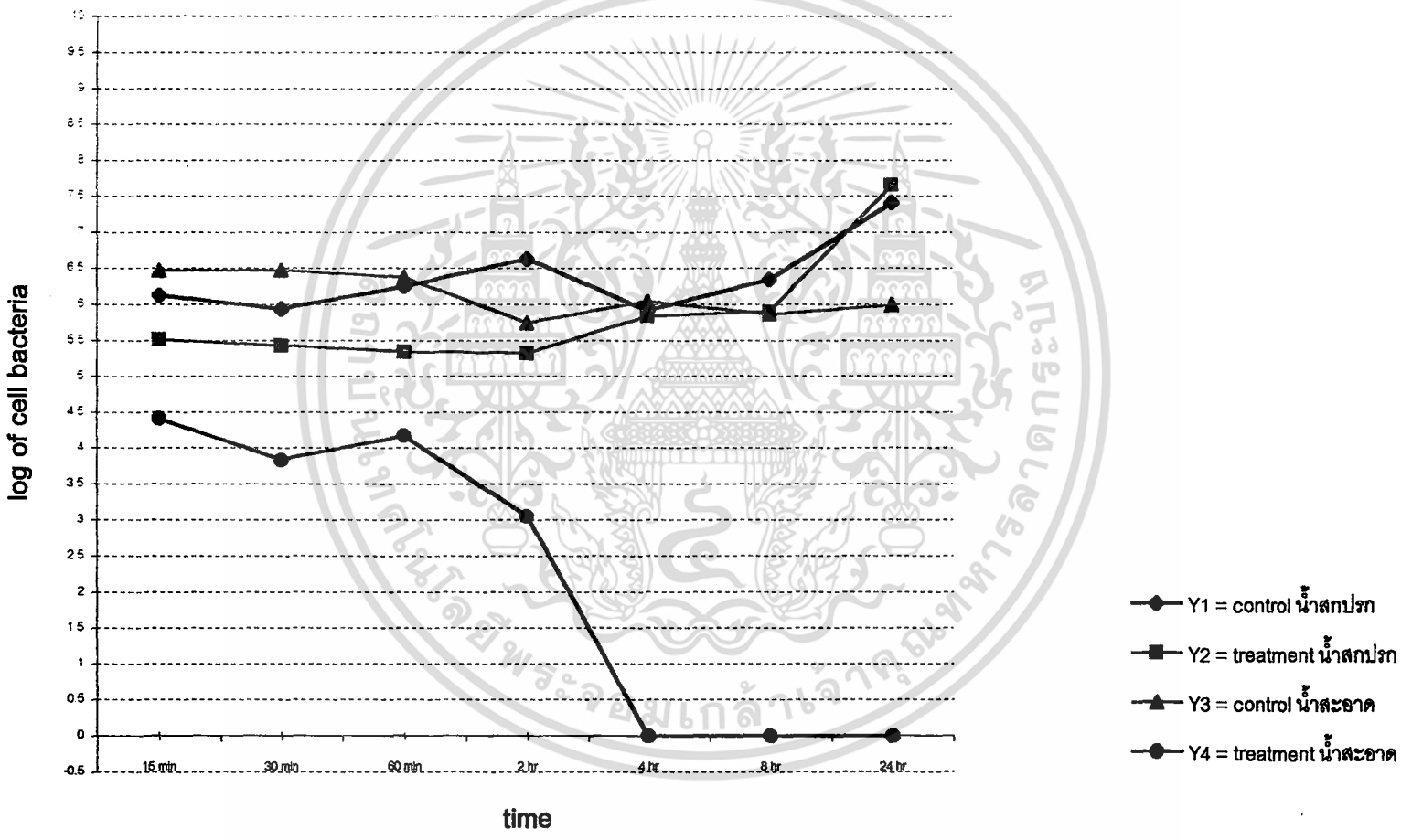
ภาพที่ 2 ความสัมพันธ์ระหว่างค่า Optical Density (OD) กับจำนวนเชื้อแบคทีเรีย *Aeromonas hydrophila* ที่ 24 ชั่วโมง อุณหภูมิ 30 °C



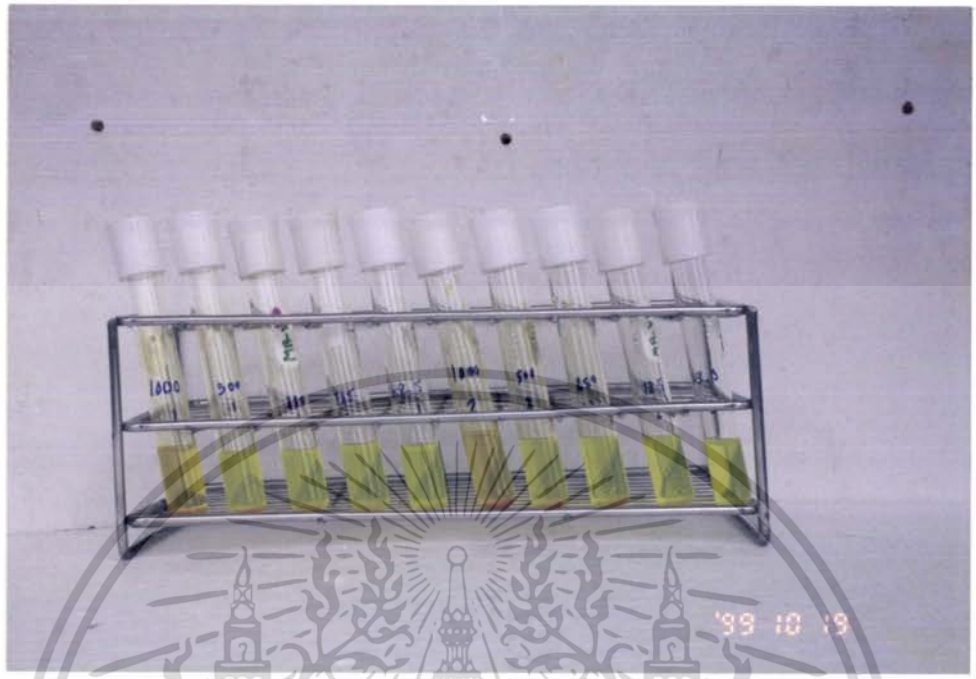
ภาพที่3 ผลการศึกษาประสิทธิภาพของ Acriflavin ความเข้มข้น 15 ppm. ต่อเชื้อ *Aeromonas hydrophila* ภายในเวลา 24 ชั่วโมง



ภาพที่4 ผลการศึกษาประสิทธิภาพของ Acriflavin ความเข้มข้น 15 ppm. ต่อเชื้อ *Pseudomonas fluorescence* ภายในเวลา 24 ชั่วโมง



ภาพที่5 ลักษณะหลอดทดสอบค่า MIC ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆของยาเหลือง (Acriflavin) ซึ่งจะนำหลอดที่มีความขุ่นไป Speard plate ที่เวลา 24 ชั่วโมง



ภาพที่ 6 ลักษณะจำนวน Colony ของเชื้อแบคทีเรีย *A. hydrophila* ที่ถูกยับยั้งด้วย Acriflavin ในการทดสอบหาค่า MIC

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. ค่า MIC ของ Acriflavin

จากการทดลองค่า MIC ของ acriflavin ต่อเชื้อ *Pseudomonas fluorescence* มีค่าอยู่ที่ 150 ppm. โดยมีเชื้อเหลืออยู่ 5.65×10 CFU/ml. ส่วนค่า MIC ต่อเชื้อ *Aeromonas hydrophila* มีค่า 125 ppm. และมีเชื้อเหลืออยู่ 3.75×10 CFU/ml. ซึ่งแสดงว่าเชื้อ *A. hydrophila* มีความไวต่อยา acriflavin มากกว่าเชื้อ *P. fluorescence* ส่วนค่า MIC ที่ได้มีค่าค่อนข้างสูง ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากยา acriflavin ถูกรบกวนจากส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ และยังพบว่าปริมาณของเชื้อที่นำมาทดสอบมีผลต่อการทดสอบอย่างมาก โดยเฉพาะในอาหารเลี้ยงเชื้อ *Pseudomanas sp.* ต่อยา Carbenicillin พบค่า MIC จะเพิ่มขึ้นจาก 5 เป็น 40 เท่า เมื่อใช้เชื้อเพิ่มขึ้นจาก 10^3 CFU/ml. เป็น 10^7 CFU/ml. (นันทนา, 2537)

อย่างไรก็ตามในการทดลองครั้งนี้ใช้จำนวนเชื้อ 10^6 CFU/ml. ตามวิธีการของ NCCLS (National Comittee of Clinical Laboratory Standard) ผลจึงน่าจะเกิดจากสาเหตุของส่วนประกอบในอาหารเลี้ยงเชื้อ

ในการนำค่า MIC ไปใช้ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียส่วนใหญ่จะใช้ในการขนส่งปลาเพื่อลดการติดเชื้อซึ่งที่ความเข้มข้น 125 และ 150 ppm. อาจเป็นอันตรายต่อปลาจึงควรใช้แช่ก่อนการขนส่งและไม่ควรแช่นานเกิน 30 นาที เพราะพบว่า Acriflavin ที่ความเข้มข้น 500 ppm. จะใช้สำหรับการฆ่าเชื้อที่มีการติดเชื้อตามบาดแผลโดยใช้เป็นเวลา 30 นาที (เกรียงศักดิ์และ อรพิน. 2528)

2. ประสิทธิภาพของ Acriflavin ต่อเชื้อ A. hydrophila และ P. fluorescence

ในการทดสอบประสิทธิภาพของ Acriflavin ใช้ที่มีความเข้มข้น 15 ppm. เพราะความเข้มข้นนี้นำมาจากค่าความเป็นพิษของยาเหลืองต่อปลาหางนกยูง ซึ่งพบว่าที่ความเข้มข้น 15 ppm. จะทำให้ปลาหางนกยูงตายภายใน 24 ชั่วโมง จึงได้นำมาทำการทดสอบดูประสิทธิภาพในการกำจัดเชื้อแบคทีเรียภายใน 24 ชั่วโมง เพื่อหาประสิทธิภาพและระยะเวลาที่เหมาะสมในการใช้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.1 เชื้อ *Pseudomonas fluorescence*

ประสิทธิภาพของ Acriflavin ความเข้มข้น 15 ppm. พบว่า ในสภาพน้ำสะอาด ที่เวลา 15 นาที มีเชื้อเหลืออยู่ 2.595×10^{5} CFU/ml. และพบว่ายาเหลืองสามารถกำจัดเชื้อแบคทีเรียได้มากขึ้นที่เวลา 2 ชั่วโมง โดยมีเชื้อเหลืออยู่ 1.1250×10^{2} CFU/ml. หลังจากนั้นประสิทธิภาพของยาเหลืองจะดีที่สุดที่ 4 ชั่วโมง โดยสามารถกำจัดเชื้อแบคทีเรียได้หมด ส่วนในน้ำที่มีอินทรีย์สาร พบว่า ประสิทธิภาพของ Acriflavin จะกำจัดเชื้อได้น้อยกว่าในน้ำสะอาด และพบว่าที่ 15 นาที มีจำนวนเชื้อเหลืออยู่ 3.25×10^{5} CFU/ml. ซึ่งไม่แตกต่างจาก Control หลังจากนั้นจำนวนเชื้อแบคทีเรียจะไม่ลดลงมากนัก (ดังภาพที่ 4) และพบว่าที่เวลา 24 ชั่วโมง เชื้อแบคทีเรียเพิ่มขึ้นเป็น 4.525×10^{7} CFU/ml. ซึ่งอาจเกิดจากแบคทีเรียที่คงเหลือเกิดการดื้อยาและสามารถเจริญเติบโตต่อไปได้ (พจนีย์, 2537)

จากการทดลอง พบว่า ประสิทธิภาพของ Acriflavin จะมีประสิทธิภาพดีในน้ำสะอาด โดยสามารถกำจัดเชื้อ *P. fluorescence* ได้หมดภายใน 4 ชั่วโมง แต่ในสภาพน้ำที่มีอินทรีย์สารจะไม่สามารถกำจัดเชื้อ *P. fluorescence* ได้ภายใน 24 ชั่วโมง ที่ความเข้มข้น 15 ppm. ดังนั้นในการใช้ acriflavin รักษาหรือกำจัดเชื้อแบคทีเรีย *P. fluorescence* จึงควรใช้ในน้ำสะอาดหรือใช้ที่ความเข้มข้นที่สูงกว่า 15 ppm. ในน้ำที่มีอินทรีย์สาร จึงจะสามารถกำจัดเชื้อ *P. fluorescence* ได้ แต่ทั้งนี้ควรพิจารณาถึงความทนได้ของสัตว์น้ำแต่ละชนิดเช่นกัน

2.2 เชื้อ *Aeromonas hydrophila*

ประสิทธิภาพของ Acriflavin ในน้ำสะอาดที่ความเข้มข้น 15 ppm. พบว่า ที่เวลา 15 นาที จำนวนเชื้อเริ่มลดลงจาก 15×10^{7} CFU/ml. เหลือ 1.035×10^{6} CFU/ml. หลังจากนั้นเชื้อแบคทีเรียค่อยๆ ลดลง อย่างไรก็ตามพบว่าจำนวนเชื้อแบคที่เรียจะไม่แตกต่างจาก Control มากนัก โดยที่เวลา 24 ชั่วโมง จะมีเชื้อเหลืออยู่ 6.0×10^{4} CFU/ml. และพบว่าในน้ำที่มีอินทรีย์สารประสิทธิภาพของ Acriflavin จะดีกว่าในน้ำสะอาด ซึ่งน้ำสะอาดน่าจะให้ผลดีกว่าในน้ำที่มีอินทรีย์สาร เนื่องจากไม่ถูกรบกวนโดยสารอินทรีย์อันทำให้ประสิทธิภาพของยาลดลงแต่จากการทดลองครั้งนี้กลับพบว่าในสภาพน้ำที่มีอินทรีย์สารสามารถฆ่าเชื้อได้หมด ตั้งแต่ 15 นาทีแรก โดยไม่มีเชื้อแบคทีเรียเหลืออยู่เลย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากการทดลองได้มีการวัดคุณภาพน้ำซึ่งค่าที่วัดได้ไม่น่ามีผลต่อการเจริญของแบคทีเรีย เพราะทั้งค่าอุณหภูมิและ pH อยู่ในช่วงที่เหมาะสมที่เชื้อ *A. hydrophila* สามารถเจริญได้ดีจึงอาจจะเป็นไปได้ว่าสาเหตุที่ทำให้ประสิทธิภาพของ Acriflavin ในน้ำที่มีอินทรีย์สารดีกว่าน้ำสะอาด คือ น้ำจากบ่อกบอาจมีสารประกอบบางชนิดรวมตัวกับยาเหลืองทำให้มีผลต่อการเข้าทำลายเซลล์ของ *A. hydrophila* ได้ดีกว่า *P. fluorescence* จึงทำให้ประสิทธิภาพในน้ำที่มีอินทรีย์สารดีกว่าในน้ำสะอาดในเชื้อ *A. hydrophila* และประสิทธิภาพในน้ำสะอาดดีกว่าในน้ำที่มีอินทรีย์สารในเชื้อ *P. fluorescence* ซึ่งควรต้องมีการศึกษาต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ข้อเสนอแนะ

1. ในการทดสอบประสิทธิภาพของยาควรมีการศึกษาองค์ประกอบของน้ำที่นำมาทดลองอย่างละเอียด
2. ในการทดลองเชื้อแบคทีเรียควรใช้เชื้อแบคทีเรียหลายๆสายพันธุ์ เพื่อดูแนวโน้มในภาพรวมของเชื้อแต่ละชนิด
3. เชื้อที่นำมาทดสอบค่า MIC และประสิทธิภาพของยาควรเป็นเชื้อจาก stock เดียวกัน และควรทำพร้อมๆกัน เพื่อป้องกันการปรับตัวเองของเชื้อแบคทีเรีย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บรรณานุกรม

เกรียงศักดิ์ พูนสุข, เยาวภา เจิงกลิ่นจันทร์ และโกเมน จันทนจักร์. 2528. ความเข้มข้นต่ำสุดของยานีโอมัยซิน และเสรตาโตมัยซิน ต่อเชื้อแอร์โรโมนาส ไฮโดรฟิล่า วารสารโรคสัตว์น้ำ. 8(3) : 149 - 153.

เกรียงศักดิ์ สายธนู และอรพิน ยิ่งยง. 2528. ประสิทธิภาพของยาฆ่าเชื้อต่อแอร์โรโมนาส ไฮโดรฟิล่า. วารสารโรคสัตว์น้ำ. 8(3) : 107 - 122.

เกรียงศักดิ์ สายธนู และ เกรียงศักดิ์ พูนสุข. 2523. ลักษณะของเชื้อแอร์โรโมนาส ไฮโดรฟิล่า. วารสารชมรมโรคปลา. 3(2) : 71 - 84.

นันทนา อรุณฤกษ์. 2537. การจำแนกแบคทีเรียกลุ่มแอร์โรปส์. สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์ กรุงเทพฯ. 67 หน้า.

บัญญัติ สุขศรีงาม. 2536. จุลชีพวิทยาสำหรับพยาบาลศาสตร์ และสาธารณสุขศาสตร์. สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์ กรุงเทพฯ. 367 หน้า.

ปณรัตน์ ผาดี และนนทวิทย์ อารีย์ชน. 2539. การใช้เบนซัลโคเนียมคลอไรด์ กลูตารัลดีไฮด์ และส่วนผสม ในการควบคุมเชื้อแบคทีเรียสกุลวิบริโอ และความเป็นพิษต่อกุ้งกุลาดำวัยอ่อน. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ.

ประกิตติ์สิน สีหนนทน์, วีระวุฒิ มหามนตรี และวนิดา โพธารามิก. 2526 ก. สภาวะทางธรรมชาติของเชื้อ *Aeromonas hydrophila* และสภาวะแวดล้อมที่อาจมีผลโน้มนำต่อการระบาดของโรคซึ่งเกิดจากเชื้อ *A. hydrophila* วารสารโรคสัตว์น้ำ. 6(3) : 165 - 170.

ประกิตติ์สิน สีหนนทน์, วีระวุฒิ มหามนตรี และวนิดา โพธารามิก. 2526 ข. การศึกษานิเวศน์วิทยาของเชื้อ *Aeromonas hydrophila* strain F 588. วารสารโรคสัตว์น้ำ. 6(3) : 115 - 124.

พจนีย์ สุริยาวงศ์. 2537. ความก้าวหน้าของยา และสมุนไพรด้านจุลชีพ. คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล. 87 หน้า.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

มาลิน จุลศิริ. 2532. ความรู้พื้นฐาน และการประยุกต์ยาด้านจุลชีพ. สถาบันพัฒนาการสาธารณสุขอาเซียน กรุงเทพฯ. 209 หน้า.

มาลินี ลิ้มโภคา. 2525. การใช้ยาด้านจุลชีพในสัตว์ (ยาปฏิชีวนะ ยาซัลฟา และสารปฏิชีวนะ). จรัลสนิทวงศ์ กรุงเทพฯ. 422 หน้า.

เยาวนิตย์ ดนยดล, วินัย กระจายวงศ์ และสิลา เรืองแป้น. 2542 ประสิทธิภาพของด่างทับทิมและจุนสีในการกำจัดเชื้อ *Flexibacter maritimus*. ในรายงานการประชุมทางวิชาการสาขาสัตว์น้ำ ครั้งที่ 37 , 3-5 กุมภาพันธ์ 2542 มหาวิทยาลัยเกษตรศาตร์, กรุงเทพมหานคร.

วัฒนา (บุญคง) พันธุ์ศักดิ์. 2541. ความรู้พื้นฐานเรื่องยา และการประยุกต์กระบวนการพยาบาลมาใช้บริหารยาแก่ผู้ป่วย. บุญศิริการพิมพ์ กรุงเทพฯ. 197 หน้า.

ศุภชัย ประพัสศร. 2538. แบคทีเรียในดินบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำ และการดื้อยาของเชื้อ *Vibrio spp.* ต่อยาต้านจุลชีพ. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.

สมาน กูจิ. 2538. การศึกษาประสิทธิภาพของสารเคมี และแบคทีเรียที่ใช้ในการปรับปรุงคุณภาพน้ำในบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำ. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.

สิทธิ บุณยรัตนผลิน. 2524. การใช้ยาและสารเคมีป้องกันและกำจัดโรคสัตว์น้ำ. วารสารการประมง 34(5) : 509-522.

สิทธิ บุณยรัตนผลิน, จิราพร เกษรจันทร์, สถาพร ดิเรกบุษราคม, ฮาวารียะห์ เรืองปราชญ์ และกิจการ ศุภมาตย์. 2526. ชนิดของเชื้อบัคเตรีที่ทำให้เกิดโรคในสัตว์น้ำ. วารสารการประมง. 36(3) : 247 - 255.

โสภณ คงสำราญ และคณะ. 2524. แบคทีเรียทางการแพทย์. โครงการตำรา-ศิริราช คณะแพทย์ศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล กรุงเทพฯ. 562 หน้า.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สมบูรณ์ ธนาศุภวัฒน์ และเกรียงศักดิ์ สายธนู. 2527. ผลของอุณหภูมิ pH และความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ที่มีต่อการเจริญของเชื้อ *Aeromonas sp.* และ NON- 01 *Vibrio chloerae.* วารสารโรคสัตว์น้ำ. 7(3) : 119 - 123.

อรุณศรี เตชัสหงษ์ และ เกรียงศักดิ์ สายธนู. 2526 ก. ประสิทธิภาพของยาฆ่าเชื้อไอโอดีนต่อแอร์โรโมนาส ไฮโดรฟิล่า. วารสารโรคสัตว์น้ำ. 6(4) : 187 - 193.

อรุณศรี เตชัสหงษ์ และเกรียงศักดิ์ สายธนู. 2526 ข. ประสิทธิภาพของด่างทับทิมในการฆ่าเชื้อแอร์โรโมนาส ไฮโดรฟิล่า. วารสารโรคสัตว์น้ำ. 6(4) : 177 - 183.

Cappoccino, J.G. and N. Sherman. 1992. Microbiology a Laboratory Manual. 3rd edition. The Benjamin/Cummings. New York. 462p.

Inglis, V., R.J. Roberts and N.R. Bromage, 1993. Bacterial Disease of Fish. Landon.

Jensen, M.M., D.N. Wright and R.A. Robinson, 1997. Microbiology for the Health Sciences. 4th Edition. Simon & Schuster, New York. 530p.

Lorian , V. E. 1991. Antibiotics in Laboratory Medicine. 3rd edition. Williams & Wilkins. Tokyo. 1248p.

Martinsen, B., E. Myhr, E. Reed and T. Hastein. 1991. In Vitro Antimicrobial Activity of Sara floxacin Against Clinical Isolates of Bacteria Pathogenic to Fish. J. Aqua Ani. Health. 3 : 235 - 241.

Mcpheason, R.M. A. Depaola, S.R. Zywno, L. Miles, Jr. Motes and A.M. Ouarin, 1991. Antibiotic Resistance in Grame – Negative Bactecia from Cultured Catfish and Aquaculture Ponds. Aquaculture 99 : 203 – 211.

Park, E. D. , D. V. Lightner, R.R. Williams and L.L. Mohney. 1995. Evaluation of Difloxacin for Shrimp Aquaculture:In Vitro Minimum Concentration, Medicated Feed Palatability, and Toxicity to the Shrimp *Penaeus vannamei.* Journal of Aquatic Animal Health 7:161-167.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Plumb, A.J. 1992. Disease Control in Aquaculture. In; Disease in Asia Aquaculture I. Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Manila, Philipines. 3-17p.

Raingdale, R.E., R.H. Richards and D.J. Alderman. 1997. Minimum Inhibitory Concentration of Selected Antimicrobial Compounds Against Flavobacterium Psychrophilum the Causal Agent of Rainbow Trout fry Syndrome (RTFS). Aquaclture 158 : 193 – 201

Roberts, R.J. 1978. Fish pathology. Bailliere Tindall. London. 318 p.

Ruangpan, L. , S. Prapadsorn and K. Sangrungruang. 1995. Minimum Inhibitory Concentration of 5 Chemotherapeutants Against Vibrio Bacteria and their Tranferring of R - plasmid. วารสารการประมง 49(6):495-500.

Shariff, M. , R.P. Subasinghe and J.R. Arthur. 1992. Disease Control in Aquaculture. In: Disease in Asian Aquaculture I. Fish Healt Section, Asian Fisheries Society, Manila, Phillipines. 3-17p.

Stecher,P.G. ,M. J. Finkel , O.H. Siegmund and B. M. Szafernski. 1960. The Merck index of chemical and drugs . Seventh edition . U.S.A. 1641 p.

Stewart, F.S. 1996. Bigger's Bacteriology and Immunology for Sytudents of Medicine. London. 603p.

Stoffregon, D.A., P.R. Borser and J.G. Babish. 1996. Antibacterial Chemotherapeutants for Finfish Aquqculture: A synopsis of Laboratory and Field Efficacy and Safety Studies. J. Aque. Ani. Health. 8:181-207.

Tonguthai, K. and P. Chanratchakool. 1992. The use of chemotherapeutic Agents in Aquaculture in Thailand. In :Disease in Asian Aquaculture I. Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Manila, Phillipines. 555-565p.

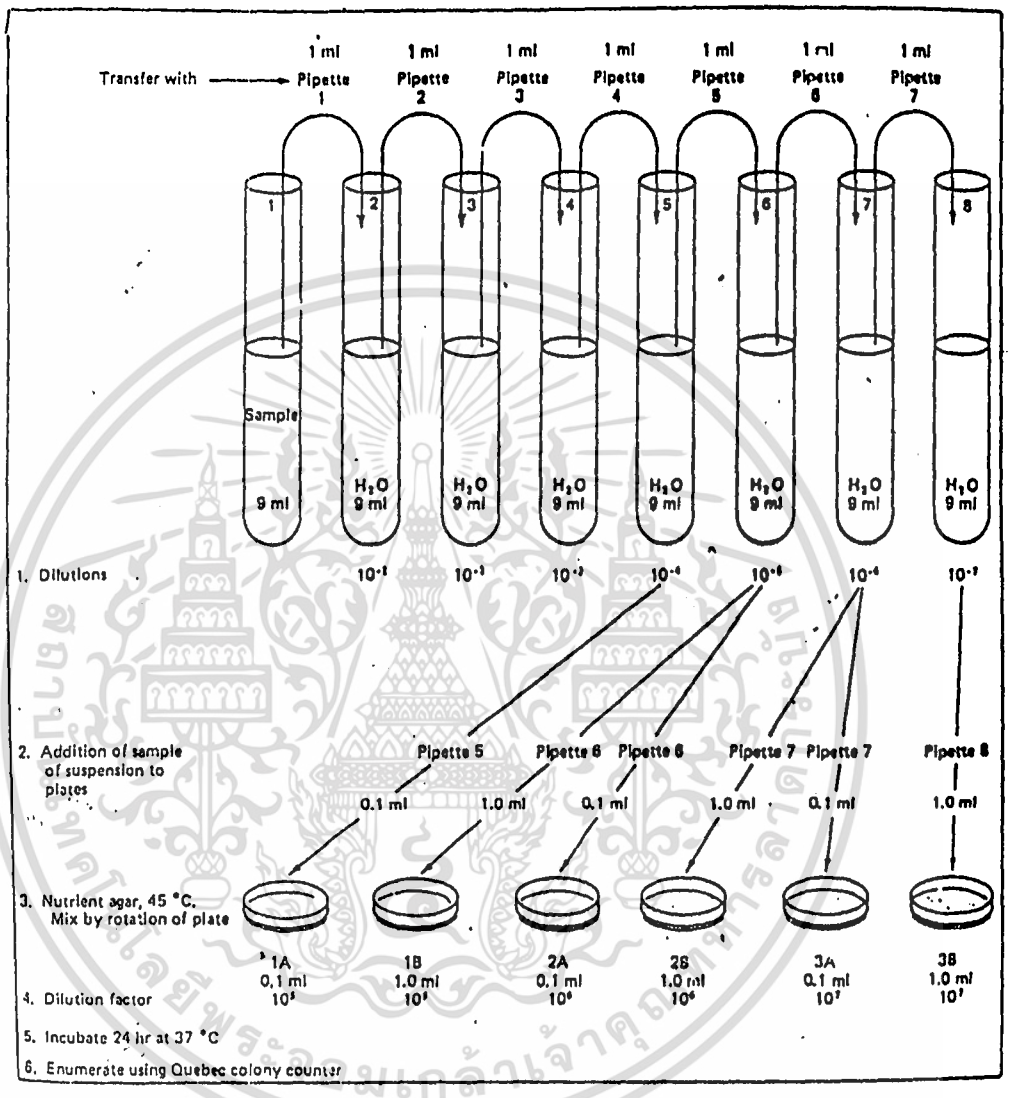
Tortora, G.J. , B.R. Funke and C.L. Case. 1992. Microbiology An Introduction 4th edition. The Benjamin/Coming. California. 810 p.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

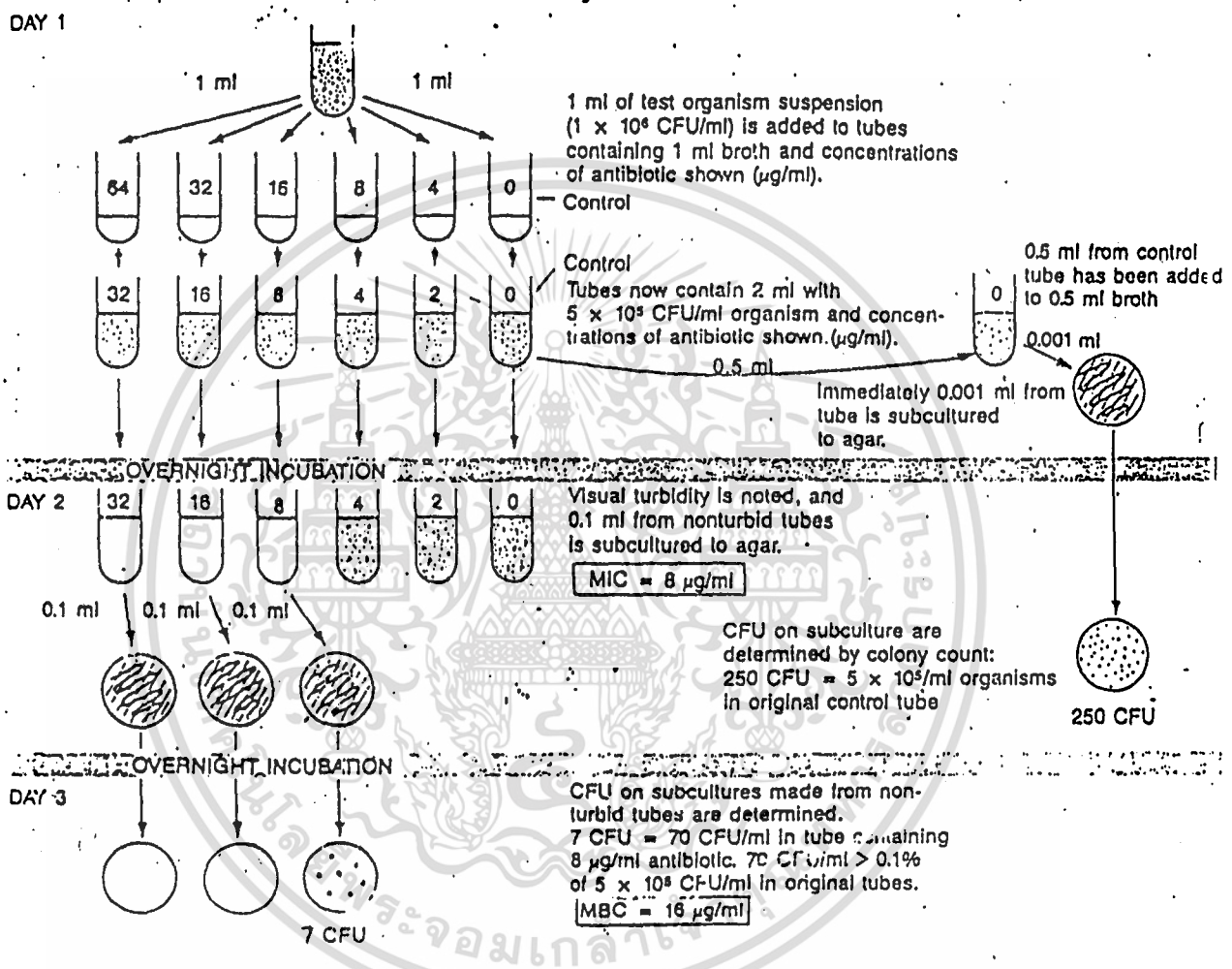
ภาพผนวกที่ 1 การ dilution แบบ ten – fold เพื่อนับจำนวน Colony ในการทำ Standard Curve



ที่มา. Cappoccino and Sherman. 1992.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพผนวกที่ 2 ขั้นตอนการทดสอบค่า MIC ตามวิธีการของ NCCLS (National Committee for Climical Laboratory Standard)



ที่มา. Tortora *et al.* 1992.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางผนวกที่ 1 การวิเคราะห์สมการกราฟมาตรฐาน ด้วยวิธีทางสถิติ Regression ของเชื้อ *Aeromonas hydrophila.*

SUMMARY OUTPUT

Regression Statistics	
Multiple R	0.955575577
R Square	0.913124684
Adjusted R Squa	0.891405855
Standard Error	0.113279485
Observations	6

ANOVA

	df	*SS*	*MS*	*F*	*Significance F*
Regression	1	0.539505909	0.539505909	42.04299802	0.002916458
Residual	4	0.051328966	0.012832242		
Total	5	0.590834875			

	Coefficients	*Standard Error*	*t Stat*	*P-value*	*Lower 95%*	*Upper 95%*	*Lower 95.0%*	*Upper 95.0%*
Intercept	7.297332994	0.114181737	63.909809	3.59065E-07	6.980313013	7.614352975	6.980313013	7.614352975
0.12	1.221871852	0.188442485	6.484057219	0.002916458	0.698670555	1.74507315	0.698670555	1.74507315

RESIDUAL OUTPUT

Observation	*Predicted 7.305*	*Residuals*	*tandard Residuals*
1	7.54537298	-0.02687298	-0.265228122
2	7.724988142	-0.034988142	-0.3453223
3	7.870390893	0.040609107	0.400799514
4	8.018237387	0.120762613	1.19189019
5	8.278496091	-0.168496091	-1.663005069
6	8.408014508	0.068985492	0.680865786

PROBABILITY OUTPUT

Percentile	*7.305*
8.333333333	7.5185
25	7.69
41.66666667	7.911
58.33333333	8.11
75	8.139
91.66666667	8.477

ตารางผนวกที่ 2 การวิเคราะห์สมการกราฟมาตรฐาน ด้วยวิธีทางสถิติ Regression ของเชื้อ *Pseudomonas fluorescence.*

SUMMARY OUTPUT

Regression Statistics	
Multiple R	0.933949407
R Square	0.872261495
Adjusted R Squa	0.840326869
Standard Error	0.112225245
Observations	6

ANOVA

	df	*SS*	*MS*	*F*	*Significance F*
Regression	1	0.344005977	0.344005977	27.31397224	0.006399942
Residual	4	0.050378023	0.012594506		
Total	5	0.394384			

	Coefficients	*Standard Error*	*t Stat*	*P-value*	*Lower 95%*	*Upper 95%*	*Lower 95.0%*	*Upper 95.0%*
Intercept	6.771090246	0.145349146	46.58500181	1.27009E-06	6.367535485	7.174645008	6.367535485	7.174645008
0.171	1.458839299	0.279135467	5.226277091	0.006399942	0.683833391	2.233845207	0.683833391	2.233845207

RESIDUAL OUTPUT

Observation	*Predicted 6.546*	*Residuals*	*tandard Residuals*
1	7.163518018	-0.065518018	-0.652717405
2	7.280225162	0.013774838	0.137230597
3	7.394014627	0.103985373	1.035944997
4	7.541357396	0.026642604	0.265424562
5	7.732465344	-0.164465344	-1.638471316
6	7.840419453	0.085580547	0.852588566

PROBABILITY OUTPUT

Percentile	*6.546*
8.333333333	7.098
25	7.294
41.66666667	7.498
58.33333333	7.568
75	7.568
91.66666667	7.926